

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10313866 A**

(43) Date of publication of application: **02 . 12 . 98**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
C12Q 1/02
G01N 33/53
G01N 33/566
// C07K 14/47
C12P 21/02
(C12P 21/02 , C12R 1:91)

(21) Application number: **09126118**

(22) Date of filing: **15 . 05 . 97**

(71) Applicant: **SHIONOGI & CO LTD**

(72) Inventor:
ODA SATOSHI
IGARASHI HISANAGA
NAITO AKIRA
SAKAGUCHI TAKESHI
TAKAI YOSHIMI

(54) **SCREENING OF AGONIST OR ANTAGONIST OF DOC2ALPHA-MUNC13 COMBINATION**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To screen the subject agonist or antagonist by reacting Doc2 α , etc., with Munc13, etc., in the presence or absence of a candidate and subsequently selecting a candidate for increasing or decreasing the binding ability.

SOLUTION: This method for screening the candidate of an agonist or antagonist of a Doc2 α -Munc13 combination

comprises reacting Doc2 α or Doc2 α analogue with Munc13 or Munc13 analogue in the presence or absence of a candidate and selecting a candidate for increasing or decreasing their binding ability. The agonist or antagonist giving an effect to the binding ability of Munc13 to Doc2 α related to the release of a calcium ion-dependent neurotransmitter can thus be screened. The proteins can control the release of the neurotransmitter or hormone.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-313866

(43)公開日 平成10年(1998)12月2日

(51) Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/53
33/566
// C 07 K 14/47

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/53
33/566
C 07 K 14/47

ZNAA
B

審査請求 未請求 請求項の数20 OL (全33頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平9-126118

(71)出願人 000001926

塩野義製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号

(22)出願日 平成9年(1997)5月15日

(72)発明者 織田 聰

兵庫県川辺郡猪名川町つつじが丘1-22-5

(72)発明者 五十嵐 久永

大阪府大阪市城東区古市3-1-2-712

(72)発明者 内藤 陽

大阪府三島郡島本町若山台2-6-2-407

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法

(57)【要約】

【課題】 神経伝達物質またはホルモンの放出を制御する物質、およびその物質を用いるスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法であって、Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とを、該候補物質の存在下および非存在下で反応させる工程；および、結合能を増加または減少させる該候補物質を選択する工程；を包含する、方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法であって、

Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とを、該候補物質の存在下および非存在下で反応させる工程；および、

結合能を増加または減少させる該候補物質を選択する工程；を包含する、方法。

【請求項2】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、キャリアタンパク質との融合タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記Munc13またはMunc13類似体が、キャリアタンパク質との融合タンパク質である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項5】 前記Munc13またはMunc13類似体が、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1または3に記載の方法。

【請求項6】 前記Doc2 α 類似体が、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項7】 前記Munc13類似体が、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載の方法によって得られる、Doc2 α とMunc13-1との結合のアゴニストまたはアンタゴニスト。

【請求項9】 神經伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる、Doc2 α またはDoc2 α 類似体を発現するベクター。

【請求項10】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項9に記載のベクター。

【請求項11】 前記Doc2 α またはDoc2 α 類似体が、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を有するポリペプチドである、請求項9に記載のベクター。

【請求項12】 神經伝達物質またはホルモンのカルシ

ウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる、Munc13またはMunc13類似体を発現するベクター。

【請求項13】 前記Munc13またはMunc13類似体が、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである、請求項12に記載のベクター。

【請求項14】 前記Munc13またはMunc13類似体が、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を有するポリペ

10 プチドである、請求項12に記載のベクター。

【請求項15】 Doc2 α またはDoc2 α 類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質。

【請求項16】 Munc13-1またはMunc13類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質。

【請求項17】 Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を含み、かつMunc13-1に対する結合能を有する、90個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【請求項18】 Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列を含み、かつDoc2 α に対する結合能を有する、904

20 個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【請求項19】 Doc2 α 類似体であって、90個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【請求項20】 Munc13類似体であって、904個以下のアミノ酸残基からなるポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、Doc2 α とMunc13との結合に影響を与えるアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法；その方法に用いるペプチド；およびそのペプチドにより神經伝達物質またはホルモンの放出を調節する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 最近、カルシウムイオン依存性の神經伝達物質の放出に関与すると考えられるタンパク質として、Doc2 α 、Munc13-1などが報告された。

【0003】 ヒトのcDNAライブラリーから単離され、発現されたDoc2タンパク質は、2つのC2領域を有することから、Double C2と命名されたタンパク質である[1および2]（以下、[]は、参考文献の番号を表し、参考文献はまとめて後に記載する）。Doc2タンパク質には、Doc2 α およびDoc2 β のタンパク質が含まれる。

【0004】 Doc2 α は脳特異的に発現しており、Doc2 α をPC12細胞で過剰発現させると、カルシウムイオン依存性の分泌が促進されることから、神經伝達物質の放出において重要な役割を果たしていると考えられている[3]。

【0005】 Doc2 β は、調べられた全ての組織で発現しており、細胞内に普遍的に存在する小胞輸送に関与していると考えられている[4]。

【0006】 Doc2 α およびDoc2 β は、上記のように2つ

のC2領域を有しているが、膜貫通領域およびラブフィリン(Rab)3A結合領域を持たない。その代わり、Doc2 α およびDoc2 β は、Doc2に特異的なアミノ酸配列が保存されている領域(Doc2特異領域)を有している[4]。

【0007】Doc2 α およびDoc2 β が有するC2領域とは、最初にプロテインキナーゼCタンパク質[5および6]で発見された領域であり、カルシウムイオンおよびホスファチジルセリンと結合する領域である[7]。プロテインキナーゼC以外に、数種類のタンパク質がC2領域を持つていることが知られている。それらは、ホスフォリパーゼA2[8]、ホスフォリパーゼC γ [9]、unc-13[10]、Munc13-1[11]、シナプトタグミンI[12]、ラブフィリン3A[13]などである。

【0008】Munc13は、線虫(Caenorhabditis elegans)のunc-13遺伝子[14]と類似するラット遺伝子がコードしているタンパク質である。線虫のunc-13遺伝子が1つのC1領域および2つのC2領域を有するのに対して、Munc13は1つのC1領域および3つのC2領域を有する[10、11、15]。C1領域には、ホルボールエステル、ジアシルグリセロールおよびホスファチジルセリンなどのリン脂質が結合することが知られている[10および15]。線虫ではunc-13遺伝子の変異により、体内にアセチルコリンが蓄積し運動障害が起こることから、unc-13はアセチルコリンなどの神経伝達物質の放出に関与していると考えられている[16]。Munc13には3種類の類似したタンパク質Munc13-1、Munc13-2およびMunc13-3が存在していることが報告されている。いずれのMunc13も脳特異的に発現しており、Munc13-1はシナプス膜に存在することが報告されている[11]。これらのことから、Munc13もunc-13と同様に、神経伝達物質の放出に関与していると考えられている[11]。

【0009】以上のように、Doc2 α およびMunc13は、神経伝達物質の分泌において重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、Doc2 α およびMunc-13が、どのような機構で神経伝達物質またはホルモンの分泌に関与しているかは全く明らかでなく、神経伝達物質またはホルモンの分泌を制御するために、その機構を解明することが望まれている。さらに、神経伝達物質またはホルモンの分泌に関与する物質のアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることで、より効果的な神経伝達物質またはホルモンの制御が期待されている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記問題点を解決するものであり、神経伝達物質またはホルモンの分泌を制御する物質、その物質を用いるスクリーニング方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、Doc2 α がMunc13-1(発見されている3つのMunc13のうちの1つ)と結合することを発見して、本発明を完成させたもので

ある。この発見に基づいて、以下の種々の知見が得られた。

【0012】(1)Doc2 α とMunc13-1の結合は、ホルボールエステルで処理することにより促進され、この促進効果はMunc13-1のC1領域を介して行なわれること、(2)Munc13-1のDoc2 α との結合に必要な領域をPC12細胞に発現させると、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質およびホルモンの分泌が阻害されること、および、(3)Munc13-1のDoc2 α との結合に必要な領域と、Doc2 α と同時に発現させると、カルシウムイオン依存性の分泌阻害効果は抑制されること。

【0013】以上から、ホルボールエステルで誘導されるDoc2 α とMunc13-1との結合は、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質およびホルモンの分泌に重要な働きをしていると考えられる。このことは、ホルボールエステルがアゴニストとして作用していることを示唆する。

【0014】以上から、Doc2 α とMunc13-1との結合の速度、強度等を測定することにより、結合を阻害する物質(アンタゴニスト)あるいは促進する物質(アゴニスト)がスクリーニングできる。スクリーニングされた物質は神経細胞の神経伝達物質放出機能を制御することができ、それにより、神経疾患の治療薬、例えば、抗痴呆薬、抗てんかん薬、向精神薬、あるいは脳代謝改善薬として使用することが可能となる。

【0015】本発明のDoc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法は、Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とを、該候補物質の存在下および非存在下で反応させる工程；および、結合能を増加または減少させる該候補物質を選択する工程；を包含する。

【0016】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、キャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0017】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、キャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0018】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0019】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0020】好ましい実施態様では、上記Doc2 α 類似体は、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を含むポリペプ

チドである。

【0021】好ましい実施態様では、上記Munc13類似体は、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0022】本発明のDoc2 α とMunc13-1との結合のアゴニストまたはアンタゴニストは、上記のいずれかの方法によって得られる。

【0023】本発明のDoc2 α またはDoc2 α 類似体を発現するベクターは、神経伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる。

【0024】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0025】好ましい実施態様では、上記Doc2 α またはDoc2 α 類似体は、Doc2 β の14位～38位のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0026】本発明のMunc13またはMunc13類似体を発現するベクターは、神経伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害するために用いられる。

【0027】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列、Munc13-1の840位～1743位のアミノ酸配列およびMunc13-1の全アミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0028】好ましい実施態様では、上記Munc13またはMunc13類似体は、Munc13-2の1110位～1695位のアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0029】本発明の融合タンパク質は、Doc2 α またはDoc2 α 類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0030】本発明の融合タンパク質は、Munc13-1またはMunc13類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質である。

【0031】本発明のポリペプチドは、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を含み、かつMunc13-1に対する結合能を有する、90個以下のアミノ酸残基からなる。

【0032】本発明のポリペプチドは、Munc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列を含み、かつDoc2 α に対する結合能を有する、904個以下のアミノ酸残基からなる。

【0033】本発明のポリペプチドは、Doc2 α 類似体であって、90個以下のアミノ酸残基からなる。

【0034】本発明のポリペプチドは、Munc13類似体であって、904個以下のアミノ酸残基からなる。

【0035】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳しく説明する。

【0036】本発明においては、特に指示のない限り、

当該分野で公知である組換えDNA法、タンパク質の分離および分析法、および免疫学的手法が採用され得る。これらの方を行なう際には、市販の酵素、キット、抗体、標識物質などを使用し得る。

【0037】(Doc2 α) 本発明のスクリーニング方法に用いられるDoc2 α は、天然源及び組換え法により入手し得る。Doc2 α 類似体には天然の完全長Doc2 β が含まれ、さらに、天然のDoc2 α の一部の配列であって少なくともDoc2 α の13位～37位のアミノ酸配列Mid (Munc13-1-interacting domain of Doc2 α : 配列表の配列番号1) を含むポリペプチド、およびDoc2 α の13位～37位のアミノ酸配列中のアミノ酸の1またはそれ以上の置換または欠失、または、これらのアミノ酸配列中への1またはそれ以上のアミノ酸の挿入または付加を有する配列を含むポリペプチドであってMunc13-1に対する結合能を有する任意のポリペプチドが含まれる。アミノ酸の1またはそれ以上の置換、欠失、挿入または付加を有するポリペプチドは、当業者に周知の方法、例えば組換えDNA技術で作成され得る。

【0038】Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を含むポリペプチドの例としては、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の1位～37位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の9位～37位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の1位～78位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、Doc2 α の1位～90位のアミノ酸配列からなるポリペプチド、およびDoc2 α の全アミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。Doc2 α は、キャリアタンパク質との融合タンパク質であってもよい。Doc2 α の全アミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列を配列番号2に示す。

【0039】(Munc13) 本発明のスクリーニング方法に用いられるMunc13またはMunc13類似体は天然源及び組換え法により入手し得る。Munc13としては、Munc13-1、Munc13-2、およびMunc13-3が用いられ得る。Munc13類似体には、天然のMunc13の一部の配列であって少なくともMunc13-1の851位～1461位のアミノ酸配列Did (Doc2 α -interacting domain of Munc13-1 : 配列表の配列番号3) を含むポリペプチド、および、このアミノ酸配列中のアミノ酸の1またはそれ以上の置換または欠失、または、これらのアミノ酸配列中への1またはそれ以上のアミノ酸の挿入または付加を有する配列を含むポリペプチドであってDoc2 α に対する結合能を有する任意のポリペプチドが含まれる。Munc13-1の全アミノ酸配列およびそれをコードするDNA配列を配列番号4に示す。

【0040】本発明のスクリーニング方法に用いられるDoc2 α 、Doc2 α 類似体、Munc13およびMunc13類似体は、キャリアタンパク質との融合タンパク質であり得る。キャリアタンパク質として使用されるタンパク質の例としては、グルタチオンSトランスフェラーゼ、ヒスチジンタグ (6つの連続するヒスチジンからなるアミノ酸配

列)、およびマルトース結合タンパク質が挙げられる。これらの融合タンパク質は、例えば当業者に周知の組換えDNA法で調製され得る。

【0041】(Doc2 α と結合するポリペプチドをコードするDNAの分離) Doc2 α または2 α 類似体と結合するポリペプチドをコードするDNAは、例えばtwo-hybrid法を用いて単離され得る。two-hybrid法の原理は、転写因子に存在するDNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインの2つのドメインを利用する。転写因子のDNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインの2つのドメインが同一タンパク質分子として発現した場合、転写が活性化される。しかし、DNA結合ドメインおよび転写活性化ドメインの2つのドメインを切り離して発現させても転写は活性化されない。他方で、別々に発現させたDNA結合ドメインと転写活性化ドメインとの結合を仲介する物質XとYとが存在すれば、DNA結合ドメインと転写活性化ドメインとが同一タンパク質分子として機能し、転写を活性化させる。従って、同一細胞内で、転写活性化ドメインと物質Xとの融合タンパク質、およびDNA結合ドメインと物質Yとの融合タンパク質を同時に発現させ、転写活性を測定することにより、物質Xと物質Yとが結合するか否かが決定される。

【0042】本発明におけるtwo-hybrid法は、まず、Doc2 α のMunc13-1との結合領域のコード配列を転写活性化ドメインのDNA配列に結合させたプラスミド、およびスクリーニングされるポリペプチドのコード配列をDNA結合ドメインのDNA配列に結合させたプラスミドを作製する。そして、この2つのプラスミドを、レポーター遺伝子(例えば β -ガラクトシダーゼ遺伝子)およびそのプロモーター配列を有する宿主に同時に形質転換して、レポーター遺伝子の発現を確認する。レポーター遺伝子の発現が確認されれば、Doc2 α と結合するポリペプチドのDNAが取得される。なお、レポーター遺伝子およびそのプロモーター配列は、上記2つのプラスミドのいずれかに含まれていてもよい。

【0043】Doc2 α またはDoc2 α 類似体と結合するポリペプチドをコードするDNAは、種々のライブラリーから得られ得る。哺乳動物の脳由来のcDNAから作製されたライブラリーが好ましく、ヒトまたはラットの脳由来のcDNAから作製されたライブラリーがより好ましく、ラットの脳由来のcDNAから作製されたライブラリーがさらにより好ましい。

【0044】(Doc2 α と結合するタンパク質の同定およびそのタンパク質をコードする全長cDNAの単離) 上記で得られたDNA配列を、プログラムBLASTおよびデータベースGenBankを用いてホモロジー検索し、Munc13-1遺伝子の一部であることが確認される。次に、このDNA配列をプローブとして標識を行い、例えば、コロニーハイブリダイゼーション方法を用いて任意のcDNAライブラリーをクローニングすることにより、Munc13-1遺伝子の全長を

コードするcDNAを単離することができる。•単離されたcDNAは、当業者に周知の方法によって配列決定される。

【0045】(Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定) 上記で得られるMunc13-1の全長cDNAから、種々の欠失変異体DNAを作製し、このDNAによりコードされるペプチドとDoc2 α またはDoc2 α 類似体との結合の有無および強さを調べることにより、Munc13-1のDoc2 α 結合領域を決定し得る。

【0046】これは、例えばtwo hybrid法を用いて以下のように行い得る。上記で得られるMunc13-1全長cDNAの配列をもとに欠失変異体を得るための種々のプライマーを設計する。1つの欠失変異体ごとに、全長cDNA(錆型DNA)、Ampli Taq DNA Polymerase、1組のプライマー、10 \times PCR用緩衝液、およびdNTP(dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP)を用いて、使用するプライマーに適切なPCR反応条件でPCR反応を行い、欠失変異体DNA断片を増幅する。得られた欠失変異体DNA断片を、two hybrid法におけるDNA結合ドメインをコードするプラスミドに挿入し、プラスミドを作製する。他方で、Doc2 α のアミノ酸配列の1位~90位に相当するcDNAを、two hybrid法における転写活性化ドメインをコードする遺伝子を含むプラスミドに挿入してプラスミドを作製する。この作製した2つのプラスミドで同一の細胞を形質転換する。上記の「Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定」と同様に、形質転換細胞におけるレポーター遺伝子の発現の有無を確認することにより相互作用の有無を知ることができる。また、レポーター遺伝子の発現量を測定することにより結合の強さを知ることができ、種々の欠失変異体の結合の強さを比較することにより、Doc2 α との結合に必要な30部位を特定し得る。

【0047】あるいは、Doc2 α を単離し、種々の改変されたMunc13タンパク質との結合性を検討することによつても、結合領域を決定し得る。

【0048】(Doc2 α のMunc13-1結合領域の決定) Doc2 α の全長cDNAから、種々の欠失変異体DNAを作製し、このDNAによりコードされるペプチドとMunc13-1との結合の有無および強さを調べることにより、Doc2 α のMunc13-1結合領域を決定し得る。

【0049】これは、上記「Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定」と同様にして、Doc2 α (1位~90位)の代わりにMunc13-1(851位~1461位)を用い、上記のMunc13-1の欠失変異体の代わりにDoc2 α の欠失変異体を用いたtwo-hybrid法により行い得る。

【0050】(組換えDoc2 α およびMunc13タンパク質の精製) 本発明のスクリーニング方法に用いられるDoc2 α またはDoc2 α 類似体およびMunc13またはMunc13類似体は、Doc2 α またはDoc2 α 類似体をコードするDNAまたはMunc13またはMunc13類似体をコードするDNAを、適切なベクターに組み込んだ発現ベクターを用いて調製され得る。この発現ベクターを、例えば、細菌、酵母、昆虫細

胞、または動物細胞に導入して、形質転換体を作製し培養する。目的のタンパク質は当業者に周知の精製方法（イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、HPLCなど）を用いて培養物中から精製される。それぞれのタンパク質をキャリアタンパク質との融合タンパク質として発現させる場合、キャリアタンパク質を特異的に吸着するカラム（例えば、アフィニティーカラム）を用いることにより、融合タンパク質を容易に精製し得る。

【0051】（インビトロでのDoc2 α とMunc13との結合）Doc2 α またはDoc2 α 類似体およびMunc13またはMunc13類似体を用いて、その結合をインビトロで試験する。これは例えば、以下のような方法で行われる。

【0052】Munc13またはMunc13類似体をコードするDNAを、適切なin vitro translation用プラスミドに挿入し、得られたプラスミドを用いて標識アミノ酸の存在下でin vitro translationを行い、そして標識されたMunc13またはMunc13類似体を得る。他方でDoc2 α またはDoc2 α 類似体（キャリアタンパク質との融合タンパク質であり得る）を、カラムに吸着させる。ペプチドを吸着させたカラムに標識されたMunc13またはMunc13類似体をアブライし、適切な条件（例えば、4°Cで5時間）で結合緩衝液中でインキュベートし、Doc2 α またはDoc2 α 類似体とMunc13またはMunc13類似体とを結合させる。結合したMunc13またはMunc13類似体をカラムから溶出し、溶出物のSDS-PAGEを行い、得られた泳動ゲルを用いてX線フィルムを感光および現像することによって確認することにより、結合したタンパク質の存在および量を確認し得る。

【0053】（インビオでのDoc2 α とMunc13との結合の確認）Doc2 α またはDoc2 α 類似体と、Munc13またはMunc13類似体とがインビオで結合していることを確認するために、Doc2 α またはDoc2 α 類似体をコードするDNAおよびMunc13またはMunc13類似体をコードするDNAを、それぞれ異なるタグとの融合タンパク質として発現し得るよう適切なベクターに挿入して発現ベクターを作製する。得られた2つの発現ベクターを細菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞に導入して同時に発現させる。細胞を溶解し、一方のタグを吸着するカラムを用いてタンパク質を吸着し、吸着されたタンパク質に他方のタグがあるか否かを検出する。検出は、ウエスタンプロッティング法によって行い得る。あるいは、いずれか一方をタグしておき、タグを吸着させ、他方のタンパク質を抗体を用いるウエスタンプロッティング法により検出する方法もある。タンパク質が検出されれば、Doc2 α またはDoc2 α 類似体とMunc13またはMunc13類似体とがインビオで結合することが示される。

【0054】（カルシウムイオン依存性の、神経伝達物質の分泌またはホルモンの分泌に対するDoc2 α 類似体またはMunc13類似体の影響）Doc2 α 類似体またはMunc13類

似体をコードするDNA断片を適切なベクターに挿入し、発現ベクターを作製する。この発現ベクターを、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌を行う細胞に導入し、形質転換体を作製する。この形質転換体および非形質転換体を、カルシウムイオン依存性分泌の誘導条件下または非誘導条件下で培養し、分泌物の量を測定する。形質転換体の分泌量と、非形質転換体の分泌量を比較することにより、Doc2 α 類似体またはMunc13類似体がカルシウムイオン依存性分泌に影響を及ぼすか否かが確認される。

【0055】（Doc2 α とMunc13-1との結合に影響する物質のスクリーニング）上記の「インビトロでのDoc2 α とMunc13との結合」のアッセイ方法において、アゴニストまたはアンタゴニストの候補物質を添加した結合緩衝液を用い、候補物質を用いないときのDoc2 α 類似体とMunc13類似体との結合量と、候補物質を添加したときのDoc2 α またはDoc2 α 類似体とMunc13またはMunc13類似体との結合量を比較することにより、Doc2 α とMunc13との結合のアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができる。タンパク質の結合量を増加させる物質はアゴニストであり、タンパク質の結合量を減少させる物質はアンタゴニストである、と判定される。

【0056】（カルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌の調節のために用いられるベクター）Doc2 α またはDoc2 α 類似体、あるいはMunc13-1またはMunc13-1類似体をコードするDNA断片を適切なベクターに挿入し、発現ベクターを作製する。この発現ベクターをカルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌を行う細胞に導入し、この細胞内でDoc2 α またはDoc2 α 類似体、あるいはMunc13-1またはMunc13-1類似体を発現させることにより、カルシウムイオン依存性の神経伝達物質またはホルモン分泌を阻害することができる。この方法を用いて、例えば、痴呆症を治療することができる。

【0057】ここで用いられるベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、Human Immunodeficiency Virus(HIV)ベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、およびワクシニアウイルスベクターが挙げられる。

【0058】

【実施例】

実施例1

酵母細胞を用いたtwo-hybrid systemによるDoc2 α に結合するタンパク質のクローニング

文献[17]に記載の方法に基づいて、ヒトDoc2 α のアミノ酸残基番号1～90とLexAのDNA結合領域とを融合タンパク質として発現するプラスミドpBTM116-Doc2 α (1-90アミノ酸)を構築した。

【0059】スクリーニングの対象となるライブラリーは、 1×10^6 個の独立したクローンを持つ、ラット脳由

来cDNAが挿入されているrat brain MATCHMAKER cDNAライブラリー (Clontech社製、CA、USA) を用いた。このライブラリーのプラスミドは、転写活性化ドメインをコードする配列を有している。

【0060】プラスミドpBTM116-Doc2 α (1-90アミノ酸) およびrat brain MATCHMAKER cDNAライブラリーを用いて、文献[18]に記載される方法で酵母L40株 (His要求株) を形質転換した。形質転換された酵母を、ヒスチジンを含まず、2.5mM 3-アミノ1H-1, 2, 4-トリアゾールを含むSD-LWH培地 (0.67% Yeast nitrogen base w/o amino acid; Difco社製、2% グルコース、300mg/1 L-イソロイシン、1500mg/1 L-バリン、200mg/1 L-アデニンヘミ硫酸塩、200mg/1 L-アルギニン塩酸、300mg/1L-リジン塩酸、200mg/1 L-メチオニン、500mg/1 L-フェニルアラニン、2000mg/1L-トレオニン、300mg/1 L-チロシン、200mg/1 ウラシル) で作製したプレート上でコロニーを形成し、かつ β -ガラクトシダーゼ活性の発現がみられる陽性クローニングを選択した。 β -ガラクトシダーゼ活性の発現については、常法に従ってアッセイを行った。これにより、7個の陽性クローニングを得た。この陽性クローニングをそれぞれ、Sanger法[19]により、Autoread Sequencing Kit (Pharmacia Biotech社製、Uppsala、Sweden) を使用して配列決定を行なった。その結果、これら7個のクローニングは全く同じ配列を持っていることが判明した。このスクレオチド解析により、最も長いcDNAを持つ陽性クローニングは、ラットMunc13-1のアミノ酸残基番号840-1743の領域がGAL4の転写活性化領域の下流の制限酵素EcoRIの部位で融合しているタンパク質を発現することがわかった。

【0061】実施例2

Munc13-1遺伝子全長cDNAの単離

two-hybridスクリーニングで得られたMunc13-1 cDNA断片 (Munc13-1のアミノ酸残基番号840-1743の領域をコードする) を、マルチプライムDNA標識システム (アマシヤム・ジャパン社製) を用いて製造者の説明書に従って³²Pで標識し、これをプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション方法を用いてラット脳cDNAライブラリー (rat brain MATCHMAKER cDNAライブラリー; Clontech社製、CA、USA) をスクリーニングした。コロニーハイブリダイゼーション方法は常法[20]に従って以下のように行った。ラット脳cDNAライブラリーを構成している (常法に従って導入してある) 大腸菌DH5 α をLB-プレート (10g トリプトン、5g イーストエキストラクト、10g NaCl、15g アガ-/1) に播き、一晩、37°Cにて培養した。プレートに生えた大腸菌のコロニーを、ナイロン膜 (Hybond-N+、アマシヤム・ジャパン社製) にトランスファーし、その後、SDS処理 (10% SDS)、アルカリ変性 (0.5M NaOH、1.5M NaCl) 、および洗浄 (2×SSC) (1×SSCは0.15M NaCl、0.015M Sodium Citrateよりなる) の操作を行った。洗浄後のナイロン膜は、6×SSC、5×D

enhhardt's solution、0.5% SDS、50% ホルムアミド、100 μ g/ml サケ精子DNAからなるハイブリダイゼーション溶液中で、プローブとして³²Pで標識したMunc13-1 cDNA断片 (430-bp) を用いて、42°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のナイロン膜を、2×SSC+0.5% SDS中で室温にて10分間、1×SSC+0.5% SDS中で65°Cにて30分間 (2回) 、および0.1×SSC+0.5% SDS中で65°Cにて30分間 (2回) で洗浄した後、X線フィルム (Kodak社製) を感光させ、そのフィルムを現像して、プローブと反応するコロニーを同定した。最終的に1つのcDNAクローニングが得られた。cDNAの塩基配列は、Sanger法[18]に従い、Autoread Sequencing Kit (Pharmacia Biotech社製、Uppsala、Sweden) を使用して配列決定した。塩基配列の決定の結果、このクローニングは、ラットMunc13-1の全長を含んでいることが明らかとなった。

【0062】実施例3

Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定

クローニングしたラットMunc13-1遺伝子全長cDNAから、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を以下のように用いて図1に示すDNA断片を得た。上記実施例2で得られたクローニングから常法に従って得たプラスミドを制限酵素EcoRIで切断したものを鋳型DNAとして用いた。鋳型DNA (ラットMunc13-1 cDNA断片) 0.5ng、Ampli Taq DNA Polymerase 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ50pmol、および10×PCR用緩衝液 (100mM Tris-HCl、pH8.3、500mM KCl、15mM MgCl₂、0.1% gelatin) 5 μ lを混和し、さらにdNTP (dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP) を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50 μ lとした。それぞれのDNA断片を得るために用いたプライマーは、DNA断片840-1743については、正プライマー 5'-CATGAATTCCCTCACATCAGTCGGAGATC-3' (配列番号5) 、逆プライマー 5'-CATGAATTCCATGGCGCAGGCCGCGCACCC-3' (配列番号6) ; DNA断片851-1461については、正プライマー 5'-CATGAATTCTGAGAAGGTGGCACCCCTACCATG-3' (配列番号7) 、逆プライマー 5'-CATGAATTCTCAGGTGGCAAACACGTGGCTGAG-3' (配列番号8) ; DNA断片851-1336については、正プライマー 5'-CATGAATTCTCACCATG-3' (配列番号7) 、逆プライマー 5'-CATGAATTCTCAGGTGGCAAACACGTGGCTGAG-3' (配列番号9) ; DNA断片851-1208については、正プライマー 5'-CATGAATTCTGAGAAGGTGGCACCCCTACCATG-3' (配列番号7) 、逆プライマー 5'-CATGAATTCTCACAGTCGACCATG-3' (配列番号10) ; そしてDNA断片1208-1461については、正プライマー 5'-CATGAATTCCCTCGAGGGGACAAGAAGGTG-3' (配列番号11) 、逆プライマー 5'-CATGAATTCTCAGGTGGCACCCCTGCC-3' (配列番号8) である。PCR反応の反応条件は、94°Cで5分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、および72°Cで2分間の反応サイクルを30回繰り返した後、72°Cで5分間

であった。PCR反応産物を、2%アガロースゲル(SeaKem Agarose、FMC社製、宝酒造より購入)で泳動した後、エチジュウムプロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を、上記のようにEcoRIで消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミドpGAD424(Clontech社製、CA、USA)の制限酵素EcoRI部位に挿入した。

【0063】Did部分の欠失しているDNA断片1-851+1461-1743については、DNA断片1-851を得るために、正プライマー5'-CATGAATTATGAAAGCGACATGGCCGGCGA-3' (配列番号12)と逆プライマー5'-CATAGCGCTCTTCCCGAAATTGGAGGCAGCG-3' (配列番号13)とのプライマーセットを用い、DNA断片1461-1743を得るために、正プライマー5'-CATAGCGCTAGCCACTCAGACGGGACACAATG-3' (配列番号14)と逆プライマー5'-CATGAA TTCCTAGGGCGCAGGCCGCGCACC-3' (配列番号15)とのプライマーセットを用いてそれぞれ上記のようにPCRを行い、それぞれのDNA断片を增幅および単離した。そして単離されたそれぞれの増幅断片をEcoRIおよびEco47IIで消化し、これをEcoRIで消化されたpGAD424と混合し、常法に従って3つのDNAの連結を行い、pGAD424の制限酵素EcoRI部位にDNA断片1-851と1461-1743とが正方向で連結されたものを選択した。

【0064】得られたプラスミドのいずれか1つと先述したpBTM116-Doc2 α (1-90アミノ酸)をともに用いて文献[17]に記載されているように酵母L40株を形質転換し、 β -ガラクトシダーゼ活性の発現を指標として、Munc13-1のDoc2 α 結合領域の決定を行った。

【0065】 β -ガラクトシダーゼ活性は、文献[21]に従って以下の方法で測定した。Munc13-1遺伝子の種々のDNA断片のいずれか1つを挿入したpGAD424プラスミドとpBTM116-Doc2 α プラスミドを用いて形質転換された酵母を、5mlのSD-LW培地(Yeastnitrogen base w/o amino acid; Difco社製: 2%グルコース、300mg/1L-イソロイシン、1500mg/1L-バリン、200mg/1L-アデニンヘミ硫酸塩、200mg/1L-アルギニン塩酸、200mg/1L-ヒスチジン塩酸、300mg/1L-リジン塩酸、200mg/1L-メチオニン、500mg/1L-フェニルアラニン、2000mg/1L-トレオニン、300mg/1L-チロシン、200mg/1ウラシル)中で30°Cにて一晩培養し、集菌後5mlの0.27%メルカプトエタノールを含むZ緩衝液(16.1g/1リン酸水素二ナトリウム七水和物、5.5g/1リン酸二水素ナトリウム一水和物、0.75g/1塩化カリウム、0.246g/1硫酸マグネシウム七水和物)中に懸濁した。この懸濁液のOD₆₀₀を分光光度計にて測定後、500 μ lを新しいエッペンドルフチューブにとり、液体窒素にて凍結後30°Cで融解することを2回繰り返した。これを30°Cのインキュベーターに置き、ここに基質溶液(4mg/ml o-ニトロフェニルガラクトシドを含むZ緩衝液)を100 μ l加えた。基質溶液添加時を0分として正確に10分後、250 μ lの1M Na₂CO₃を加えて反応

を停止した。この反応液を14,000rpmで10分間遠心後、その上清のA₄₂₀を分光光度計で測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性(unit)は以下の式で計算した。

【0066】

$$\text{unit} = (1000 \times A_{420}) / (t \times V \times OD_{600} \times 1 / 0.85)$$

t: 反応時間(分)

V: 反応に使用した培養液量(ml)

以上の実験の結果を図1に示す。

【0067】図1は、Munc13-1およびDoc2 α の一次構造模式図、酵母two-hybrid systemに用いた各変異体、X-galの発色反応の強さから推定した結合能力、および β -ガラクトシダーゼ活性を示す。 β -ガラクトシダーゼ活性の強さは、結合能力の強さを示す。Munc13-1およびDoc2 α の一次構造模式図のC1はC1領域を、C2はC2領域を示し、結合能の++は強い発色を、+は弱い発色を、-は発色しなかったことを示す。Munc13-1のアミノ酸残基番号851-1461の領域を含むペプチドの結合能が強く、この領域のアミノ酸残基に欠失が存在すると結合能が著しく減少することから、Munc13-1のアミノ酸残基番号851-1461の領域がDoc2 α との結合に必要であることが明らかとなった。従って、この領域をDid(Doc2 α -interacting domain of Munc13-1)と命名した。Didの配列を、配列番号1に示す。

【0068】実施例4

Doc2 α のMunc13-1結合領域の決定

ヒトDoc2 α 遺伝子全長cDNAから、以下のようにPCRを用いて図2に示すDNA断片を得た。PCR反応は、錠型DNA(ヒトDoc2 α cDNA断片)0.5ng、Ampli Taq DNA Polymerase 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ50pmol、および10 \times PCR用緩衝液5 μ lを混和し、さらにdNTP(dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP)を最終濃度200mMとなるよう加え、滅菌蒸留水で最終的に50 μ lとして行った。それぞれのDNA断片を得るために用いたプライマーは、DNA断片1-90については、正プライマー5'-CATGAATTATGAGGGGCCCGCAGGGCGAT-3' (配列番号16)、逆プライマー5'-CATGAATTCTCAGGCGGTGGCATCCGAGTC-3' (配列番号17)；DNA断片1-78については、正プライマー5'-CATGAATTATGAGGGCCCGCAGGGCGAT-3' (配列番号16)、逆プライマー5'-CATGAATTCTCACTCCCGCACTCCTAGGGCGT-3' (配列番号18)；DNA断片1-37については、正プライマー5'-CATGAATTATGAGGGCCCGCAGGGCGAT-3' (配列番号16)、逆プライマー5'-CATGAATTCTCAGGGGAAGTAGTCAGAGATCTG-3' (配列番号19)；DNA断片9-37については、正プライマー5'-CATGAATTATCAGCCATCAACATCCAGGAG-3' (配列番号20)、逆プライマー5'-CATGAATTCTCAGGGGAAGTAGTCAGAGATCTG-3' (配列番号19)；DNA断片13-37については、正プライマー5'-CATGAATTATCAGGGAGCACATGGCCATC-3' (配列番号21)、逆プライマー5'-CATGAATTTCAGAGATCTG-3' (配列番号19)；DNA

50 TCAGGGGAAGTAGTCAGAGATCTG-3' (配列番号19)；DNA

断片9-32については、正プライマー5'-CATGAATTCAATGGCAGGAG-3' (配列番号20)、逆プライマー5'-CATGAATTCTCAGATCTGGGGATGGGCGGGAT-3' (配列番号22) ; DNA断片19-37については、正プライマー5'-CATGAATTCAACGTGTGCCCCGGGCCCCATC-3' (配列番号23)、逆プライマー5'-CATGAATTCTCAGGCTGAGGACAGAGCCCC-3' (配列番号24)、逆プライマー5'-CATGAATTCTCAGGCTGAGGACAGAGCCCC-3' (配列番号25) である。PCRの反応条件は、94°Cで5分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、および72°Cで2分間の反応サイクルを30回繰り返した後、72°Cで5分間であった。反応産物は、2%アガロースゲルで泳動した後、エチジュウムプロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を、上記のようにEcoRIで消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミドpBTM116の制限酵素EcoRI部位に挿入した。得られたプラスミドのいずれか1つと、先述したpGAD424のEcoRI部位にラットMunc13-1-Did (これは、Munc13-1の851~1461位のアミノ酸配列を有するペプチドである) を挿入したプラスミドとをともに用いて、文献[18]に記載されているように酵母L40株を形質転換し、β-ガラクトシダーゼ活性の発現を指標として、Doc2αのMunc13-1との結合領域の決定をおこなった。β-ガラクトシダーゼ活性は、上記の実施例3と同じ方法を用いて測定を行った。

【0069】以上の実験の結果を図2に示す。図2は、Munc13-1およびDoc2αの一次構造模式図、酵母two-hybrid systemに用いた各変異体、X-galの発色反応の強さから推定した結合能力、およびβ-ガラクトシダーゼ活性を示す。Munc13-1およびDoc2αの一次構造模式図のC1はC1領域を、C2はC2領域を示し、結合能の++は強い発色を、+は弱い発色を、-は発色しなかったことを示す。Doc2αのアミノ酸残基番号13-37の領域を含むペプチドの結合能が強く、この領域のアミノ酸残基に欠失が存在すると結合能が著しく減少することから、Doc2αのアミノ酸残基番号13-37の領域がMunc13-1との結合に必要であることが明らかとなった。従って、この領域をMid (Munc13-1-interacting domain of Doc2α) と命名した。Midの配列を、配列番号2に示す。

【0070】実施例5

Doc2ファミリータンパク質とMunc13ファミリータンパク質との結合

ヒトDoc2β遺伝子全長cDNAを鑄型として以下のようにPCR反応を行い、ヒトDoc2βのC2領域の上流部分であるアミノ酸残基番号1-122の領域をコードするDNA断片を得た。鑄型DNA(ヒトDoc2β cDNA断片) 0.5ng、Ampli Taq DNA Polymerase5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ50pmol、および10×PCR用緩衝液5μlを混和し、さら

にdNTP (dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP) を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50μlとした。用いたプライマーは、正方向プライマー5'-CATGAA TTCATGACCCCTCCGGCGCGGGAG-3' (配列番号26) 、および逆方向プライマー5'-CATGAATTCTCAGGCAGTGCAGTC GTCCGACTCGT-3' (配列番号27) である。PCR反応の反応条件は、94°Cで5分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、および72°Cで2分間の反応サイクルを30回繰り返した後、72°Cで5分間であった。PCR反応産物を、2%アガロースゲル泳動した後、エチジュウムプロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物をEcoRIで消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミドpBTM116の制限酵素EcoRI部位に挿入した。

【0071】一方、ラットMunc13-2のラットMunc13-1と類似性が高い領域(アミノ酸残基番号1110-1695)をコードするDNA断片を、以下のようにPCRを用いてラット脳cDNAライブラリー (rat brain MATCHMAKER cDNAライブラリー; Clontech社製、CA、USA) より得た。鑄型DNA (ラット脳cDNAライブラリー) 0.5mg、Ampli Taq DNA Polymerase 5ユニット、オリゴヌクレオチドをそれぞれ50pmol、および10×PCR用緩衝液5μlを混和し、さらにdNTP (dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP) を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50μlとした。

用いたプライマーは、正方向プライマー5'-CATGAATTCTCAGGTGCCCTGCTGGTCAATGAG-3' (配列番号28) 、および逆方向プライマー5'-CATGAATTCTCAGGTGCCCTGCTGGTCAATGAG-3' (配列番号29) である。PCR反応の反応条件は、94°Cで5分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、および72°Cで2分間の反応サイクルを30回繰り返した後、72°Cで5分間であった。PCR反応産物を、2%アガロースゲルで泳動した後、エチジュウムプロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そして単離した。単離された反応産物を、DNA配列決定して確認し、上記のようにEcoRIで消化し、その後、常法に従って酵母発現プラスミドpGAD424の制限酵素EcoRI部位に挿入した。

【0072】このようにして得られた2つのプラスミド、ならびに上記のプラスミドpBTM116-Doc2α(1-90アミノ酸)およびpGAD424-Munc13-1-Didを、図3に示す組み合わせで用いて、文献[17]の方法で酵母L40株を形質転換し、β-ガラクトシダーゼ活性の発現を指標として、Doc2αおよびDoc2βに対するMunc13-1およびMunc13-2の結合能を調べた。β-ガラクトシダーゼ活性は、上記の実施例3と同じ方法を用いて測定を行った。

【0073】結果を図3に示す。図3は、Munc13-1、Munc13-1、Doc2αおよびDoc2βの一次構造模式図、酵母two-hybrid systemに用いた各変異体、X-galの発色反応の強さから推定した結合能、およびβ-ガラクトシダーゼ活性を示す。Munc13-1、Munc13-1、Doc2αおよびDoc2βの一次構造模式図のC1はC1領域を、C2はC2領域

を示し、結合能の++は強い発色を、+は弱い発色を示す。Doc2 α またはDoc2 β と、Munc13-1またはMunc13-2とのいずれの組み合わせでも結合がみられたことから、Doc2 α およびDoc2 β は共に、Munc13-1およびMunc13-2と結合することが明らかになった。これにより、Doc2ファミリーのタンパク質とMunc13ファミリーのタンパク質とが結合することが明らかになった。

【0074】Doc2 α のMid領域（アミノ酸残基13位～37位）はDoc2 β のMid領域（アミノ酸残基14位～38位）と92%の類似性を有しており、Munc13-1のDid領域（アミノ酸残基851位～1461位）はMunc13-2のDid領域（アミノ酸残基1110位～1695位）と81%の類似性を有している。この領域は、それぞれのタンパク質にとって、他のタンパク質と類似性がない特異的な領域であるので、両者の結合も特異的であると考えられる。

【0075】実施例6

大腸菌におけるDoc2 α およびMunc13-1タンパク質の発現ならびに発現されたタンパク質の精製

Doc2 α のアミノ酸残基番号1から90に相当する部分を発現するベクターpGEX-2T-Doc2-N、およびMunc13-1のDid領域（アミノ酸残基番号851から1461）を発現するベクターpGEX-2T-Munc13-1-Didを、以下の方法で構築した。まず、Doc2 α についてはpSPORT1ベクターを鋳型にして、Munc13-1については実施例2で得られたMunc13-1遺伝子全長を含むクローンから単離されたプラスミドを鋳型にして、PCR反応を行うことによりそれぞれのアミノ酸配列をコードするDNA断片を得た。pSPORT1ベクターには、ヒト脳からクローニングしたDoc2のcDNAの全長1.7kbが組み込まれており、このベクターは、Gibco-BRL社から入手可能である。鋳型DNA 0.5ng、Ampli Taq DNA Polymerase 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ100pmol、および10×PCR用緩衝液5 μ lを混合し、さらにdNTP（dATP、dGTP、dTTP、およびdCTP）を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50 μ lとした。

それぞれ用いたプライマーは、Doc2 α については、正プライマー5'-CATGGATCCATGAGGGCCGCAGGGCGAT-3'（配列番号30）；逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGGGCGTGGCATCATCCGAGTC-3'（配列番号31）、Munc13-1については、正プライマー5'-CATGGATCCGAGAAGGTGGCACCC TACCATG-3'（配列番号32）；逆プライマー5'-CATGG ATCCTCAGCTTGGCAGTTCCACCTGCC-3'（配列番号33）であった。PCR反応の反応条件は、94°Cで5分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、および72°Cで2分間の反応サイクルを30回繰り返しであった。PCR反応産物を、2%アガロースゲルで泳動した後、エチジウムプロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を、製造者の説明書に従ってBamH Iで消化した。次に、消化して得られたそれぞれのDNA断片を、常法に従ってpGEX-2T（Pharmacia社製）のBamH I部位に挿入した。このようにして、pGEX-2

T-Doc2-NおよびpGEX-2T-Munc13-1-Didが得られた。

【0076】pGEX-2T-Doc2-NまたはpGEX-2T-Munc13-1-Didを用いて、常法に従って大腸菌DH5 α 株を形質転換した。得られた形質転換株を、それぞれ、LB培地（1リットルあたり10gトリプトン、5gイーストエキストラクトおよび10g NaCl）中37°Cで培養し、次いで0.1mM IPTG（isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside）を加えた後、30°Cで3時間培養することにより、タンパク質誘導を行った。タンパク質誘導後の培養物を、それぞれ、1

10 0,000 \times gで20分間遠心分離することにより集菌し、上清を捨て、細菌ペレットを10mlのPBS(-)（8g NaCl、0.2g KC1、2.9g Na₂HPO₄、0.2g KH₂PO₄/1L蒸留水、pH7.4）に懸濁させた。細菌懸濁液に超音波処理を行って細胞を破碎し、次いで100,000 \times gで、1時間、4°Cの条件で遠心分離した。得られた上清をそれぞれグルタチオンセファロースカラム（Pharmacia社製）にかけ、カラムをPBSで洗浄し、次いで溶出緩衝液（20mMグルタチオン、50mM Tris-HCl、pH8.0）を用いて溶出することにより、融合タンパク質を精製した。

20 【0077】得られたそれぞれの形質転換株は、それぞれのタンパク質をグルタチオントランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現した。

【0078】実施例7

Doc2 α とMunc13-1の試験管内の結合

まず、pGEM-1プラスミド（Promega社製）にHAタグ（アミノ酸配列、Met-Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala）をコードするDNA断片を挿入したプラスミドpGEM-HAを作製した。これは、HAタグを含む化学合成した、互いに相補的な2つのオリゴヌクレオチド5'-AATTCCGTACGA

30 TGTACCCATACGACGTCCAGACTACGCTGGTACCG-3'（配列番号34）および5'-GATCCGGTACCAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGTACATCGTACCG-3'（配列番号35）をアニールさせた後、制限酵素EcoRIおよびBamHIで切断したpGEM-1と正方向で連結することにより作製した。さらにpBluescript

（Stratagene社製）プラスミドにmycタグ（アミノ酸配列、Met-Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Gln-Glu-Asp-Leu）をコードするDNA断片を挿入したプラスミドpBluescript-mycを作製した。これは、mycタグを含む化学合成した、互いに相補的な2つのオリゴヌクレオチド5'-GATC

40 GATGGAGCAGAACAGCTTATCAGCGAGGAGGACCTGG-3'（配列番号36）および5'-GATCCCAGGTCCCTCGCTGATAAGCTCTGCTCCATC-3'（配列番号37）をアニールさせた後、制限酵素BamHIで切断したpBluescriptと正方向で連結することにより作製した。

【0079】次に、ヒトDoc2 α のアミノ酸残基1位～40位、1位～241位、および90位～400位のアミノ酸配列、ならびにラットMunc13-1のアミノ酸残基1位～1743位、851位～1461位、および1位～851位+1461位～1743位のアミノ酸配列をコードするDNA断片を、PCR反応を行うことによって得た。鋳型DNA 0.5ng、Ampli Taq DNA P

olymerase 5ユニット、2種のプライマーをそれぞれ50p mol、および10×PCR用緩衝液5μlと混和し、さらにdNTP (dATP、dGTP、dTTP、dCTP) を最終濃度200mMとなるように加え、滅菌蒸留水で最終的に50μlとした。鑄型DNAは、ヒトDoc2αについては、ヒトDoc2α全長cDNAを用い、ラットMunc13-1については、ラットMunc13-1全長cDNAを用いた。プライマーは、ヒトDoc2αのアミノ酸残基1位～400位については、正プライマー5'-CATGGATCCAT GAGGGGCCAGGGCGAT-3' (配列番号38) 、逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGGCTGAGGACAGAGCCCC-3' (配列番号39) ;ヒトDoc2αの1位～241位については、正プライマー5'-CATGGATCCATGAGGGGCCAGGGCGAT-3' (配列番号38) 、逆プライマー5'-CATGGATCCTCACTGCTCCA AGTCCTTCAGATA-3' (配列番号40) ;ヒトDoc2αの90位～400位については、正プライマー5'-CATGGATCCCTAG GCAAGCTGGAGTTGAC-3' (配列番号41) 、逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGGCTGAGGACAGAGCCCC-3' (配列番号39) ;ラットMunc13-1のアミノ酸残基1位～1743位については、正プライマー5'-CATGGATCCATGAAGCGACATGGC CGGCGA-3' (配列番号42) 、逆プライマー5'-CATGGATCCCTAGGGCCAGCGCGGCC-3' (配列番号43) ;およびラットMunc13-1の851位～1461位については、正プライマー5'-CATGGATCCGAGAAGGTGGCACCTACCATG-3' (配列番号44) 、逆プライマー5'-CATGGATCCTCAGCTTGCA GTTTCACCCCTGCC-3' (配列番号45) を用いた。PCR反応の反応条件は、94°Cで5分間加熱後、94°Cで1分間、55°Cで1分間、そして72°Cで2分間の反応サイクルを30回繰り返した後、72°Cで5分間であった。得られた反応産物を、それぞれ2%アガロースゲルで泳動した後、エチジュウムプロマイド(500ng/ml)で5分間染色して確認し、そしてゲルから単離した。単離された反応産物を、Doc2αについては上記のようにBamHIで消化した後、pGE M-HAのBamHI部位に、Munc13-1については上記のようにBamHIで消化した後、pBluescript-mycのBamHI部位に挿入した。この部位はT7プロモーターの下流であり、この部位に挿入することにより、T7 RNAポリメラーゼによってそれぞれのDNA断片からmRNAが合成される。

【0080】Did部分の欠失しているMunc13-1のアミノ酸残基1-851+1461-1743をコードするDNA断片については、アミノ酸残基1-851をコードするDNA断片を得るために、正プライマー5'-CATGGATCCATGAAGCGACATGGCC CGCGA-3' (配列番号42) と逆プライマー5'-CATAGCG CTCTTCCCGAAATTGGAGCCAGCG-3' (配列番号13) のプライマーセットを用い、アミノ酸残基1461-1743をコードするDNA断片を得るために、正プライマー5'-CATAGCGCTAGCCACTCAGACGGGACACAAATG-3' (配列番号14) と逆プライマー5'-CATGGATCCCTAGGGCGCAGGCGCGGCC-3' (配列番号43) のプライマーセットを用いてそれぞれ上記のようにPCRを行い、それぞれのDNA断片を増幅および単離した。そして単離されたそれぞれの増幅断

片をBamHIおよびEco47IIIで消化し、これをBamHIで消化されたpBluescript-mycと混合し、常法に従って3つのDNAの連結を行い、pBluescript-mycの制限酵素BamHI部位にDNA断片1-851と1461-1743とが正方向で連結されたものを選択した。

【0081】得られたこれらのプラスミドを鑄型として、³⁵S-メチオニン存在下で、TNT T7 coupled Reticulocyte Lysate System (Promega社製) を製造者の説明書に従って用いてin vitro translationにより³⁵Sで標識されたタンパク質を合成した。

【0082】Doc2αとMunc13-1との試験管内での結合については、まず、実施例6で得られたGSTとMunc13-1との融合タンパク質2μgを、結合緩衝液(150mM NaCl、50mM HEPES、pH7.4、および1mM EGTA)に溶かし、グルタチオンセファロースカラム(Pharmacia社製)に注ぎ、4°Cで1時間反応させることによりカラムに結合させた。次いで、上記³⁵Sで標識されたDoc2αの変異体のいずれか1つ(2μg)を、結合緩衝液(150mM NaCl、50mM Hepes、pH7.4、および1mM EGTA)に溶解し、カラムに加え、そして4°Cで5時間反応させた。次いで、カラムを結合緩衝液で4回洗浄し、そして100μlの溶出緩衝液を用いて結合したタンパク質を溶出した。得られた溶出物に、1mgのSDSを添加し、100°Cで5分間反応させSDS化した。SDS化したタンパク質を、12%アクリルアミドゲルを用いるSDS-PAGEにアプライし、泳動後、ゲルを乾燥し、X線フィルム(Kodak社製)を感光させ、現像して出てくるバンドを解析した。

【0083】結果を図4に示す。図4は、Doc2αの一次構造模式図、in vitro translationにより作製した³⁵S標識Doc2αとその変異体(1から3)、およびGST-Munc13-Didとの結合反応後に得られた溶出物を電気泳動したゲルのオートラジオグラフィーを示す。矢印は、GST-Munc13-Didに結合したDoc2αとその変異体の位置を示す。また、オートラジオグラフィーの右側に示した数字は、タンパク質の分子量(単位はダルトン、Kはキロ)を示す。この結果、Doc2αの13位～37位の領域を有するタンパク質(1および2)は、試験管内でもMunc13-1のDid領域と結合することが明らかになった。

【0084】次に、実施例6で得られたGSTとDoc2αとの融合タンパク質(2μg)をグルタチオンセファロースカラム(Pharmacia社製)に結合させた。次いで、上記³⁵Sで標識されたMunc13-1の変異体のいずれか1つ(2μg)を、Doc2αの変異体について記載したのと同様にして、カラムに固定化されたDoc2αと結合したタンパク質の溶出物を得、SDS-PAGEを行い、そしてバンドの解析を行った。

【0085】結果を図5に示す。図5は、Munc13-1の一次構造模式図、in vitro translationにより作製した³⁵S標識Munc13-1とその変異体(1から3)、およびGST-Doc2α(1-90)との結合反応後に得られた溶出物を電気泳

動したゲルのオートラジオグラフィーを示す。矢印は、GST-Doc2 α (1-90) に結合したMunc13-1とその変異体の位置を示す。また、オートラジオグラフィーの右側に示した数字はタンパク質の分子量 (単位、ダルトン、Kはキロ) を示す。この結果、Munc13のDid領域を含むタンパク質 (1 および 2) は、試験管内でもDoc2 α のMid領域を含むアミノ酸残基番号1-90の領域と結合することが明らかになった。

【0086】試験管内でもDoc2 α はMunc13-1と結合することが明らかとなつたことから、Doc2 α とMunc13-1との結合を阻害または促進する物質の試験管内での検索が可能となつた。

【0087】実施例8

PC12細胞でのDoc2 α とMunc13-1との結合

ラット副腎褐色細胞腫由来であるPC12細胞 (PC12 pheno chromocytoma cell line; 文献30を参照のこと) を、35 mm ϕ dishに 5×10^5 となるように播き、10%牛胎児血清および5%馬血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で37°Cで18時間培養した。培養後のPC12細胞を、T7RN Aポリメラーゼをコードするワクシニアウイルス (L0-T7 株) (東京都臨床研小原道法先生より贈与された) で30分間感染させ、次いで、上記実施例7で作製した、ヒトDoc2 α のアミノ酸残基1位～400位をコードするcDNA断片がpGEM-HAに挿入されたプラスミドおよびラットMunc13-1のアミノ酸残基1位～1743位をコードするcDNAがpBluescript-mycに挿入されたプラスミドを、リポフェクトアミン (Gibco BRL社製) を用い、製造者の説明書に従つてトランスフェクションを行うことにより導入した。

【0088】トランスフェクション後、細胞をさらに5時間培養した。分泌刺激を与えた場合と、与えない場合のDoc2 α タンパク質とMunc13-1タンパク質の発現量を比較するために、高濃度カリウム処理またはTPA処理を行い、無処理のものをコントロールとした。分泌刺激を与える場合は、培養後のPC12細胞を、PSS (140mM NaCl、4.7mM KCl、2.5mM CaCl₂、1.2mM MgSO₄、1.2mM KH₂P_O₄、20mM HEPES、pH7.4、および11mM glucose) に懸濁して洗浄し、遠心分離を行い、ペレットを、60mM KClおよび85mM NaClを含むPSS (高濃度カリウム処理の場合) または100nMのTPA (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate) を含むPSSに懸濁し、37°Cで、10分間処理をおこなつた。処理後に遠心分離して細胞を回収し、細胞を洗浄し、500 μ lの溶解緩衝液 (20mM Tris/HCl at pH7.5、150mM NaCl、1% NP-40および10mM p-amidino-phenylm ethanesulfonyl fluoride) に懸濁して30分間放置することにより細胞を溶解し、得られた細胞溶解液を100,000 \times gで1時間遠心分離し、上清を得た。

【0089】この上清を細胞質画分とした。この細胞質画分 (500 μ l) に3 μ gの抗HAモノクローナル抗体 (Berkely Antibody 社製) および20 μ lのプロテインA-セファロース (Pharmacia社製) を加え、4°Cで4時間反応

させることにより、免疫沈降を行つた。反応後の細胞質画分を、1,000 \times gで1分間遠心分離し、プロテインA-セファロースに結合したタンパク質のペレットを得た。このペレットに1 mgのSDSを含むSDS溶液100 μ lを加えて100°Cで5分間加熱することにより、プロテインA-セファロースに結合したタンパク質をSDS化すると共にプロテインA-セファロースから遊離させた。SDS化後に溶液を1,000 \times gで1分間遠心分離し、SDS化したタンパク質を含む上清を得た。この上清を、12%ポリアクリルアミドゲルを用いるSDS-PAGEにかけ、ナイロン膜 (商品名Immobilon、Millipore社製) に電気的に移した。この膜を5%スキムミルク (Difco Laboratories社製) の入ったPBS緩衝液中でブロッキングを行つた後、1000倍希釈の抗mycモノクローナル抗体 (ベーリンガー マンハイム社製) および5%スキムミルクを添加したPBS緩衝液中で、室温、1時間反応させた。その後、1% Tween20の入ったPBSを用いて、室温で3回洗浄した。次に、5%スキムミルクおよび1000倍希釈したhorseradish peroxidaseと結合した抗マウスイムノグロブリンヒツジポリクローナル抗体 (アマシャム・ジャパン社製) を添加したPBS緩衝液中で、室温にて1時間反応させた。その後、1% tween20の入ったPBSを用いて、室温で3回洗浄した。洗浄後、ECLウエスタンプロットティング検出システム (アマシャム・ジャパン社製) を製造者の説明書に従つて用いて発色反応を行い、X線フィルム (Kodak社製) を感光させ、現像して出てくるバンドを検出した。このバンドは、HAタグとDoc2 α の融合タンパク質に結合したmycタグとMunc13-1の融合タンパク質を示す。

【0090】結果を図6に示す。図6は、抗HA抗体を用いた免疫沈降産物を、抗myc抗体でウエスタンプロット解析した結果であり、1は分泌刺激していないPC12細胞、2は高濃度カリウム刺激により分泌刺激したPC12細胞、3はTPA処理により分泌刺激したPC12細胞を示す。左側の矢印は、Doc2 α に結合したMunc13-1の位置を示す。また、右側の数字はタンパク質の分子量 (単位、ダルトン、Kはキロ) を示す。これにより、Doc2 α はMunc13-1とPC12細胞中でも結合することが示された。また、その結合は高濃度カリウムイオンあるいはTPA処理により促進されることが明らかになつた。高濃度カリウムイオン刺激などにより分泌を起こさせると細胞内カルシウムイオン上昇とジアシルグリセロールの産生が誘導されるという従来の報告から[22]、ジアシルグリセロールと同様の作用を示すTPAで誘導されるDoc2 α とMunc13-1の結合は、カルシウムイオン依存性の分泌に重要な働きをしていると考えられる。したがつて、Doc2 α とMunc13-1の結合がカルシウムイオン依存性の分泌に働いていることが予想される。

【0091】実施例9

PC12細胞での成長ホルモンの分泌に対するDoc2 α -MidまたはMunc13-1-Didの影響

ヒトDoc2 α -MidをコードするDNA断片が発現ベクターpEF-Bosに挿入されたプラスミドは以下のようにして構築した。実施例4で得られたDoc2 α -Mid（これは、Doc2 α の13位～37位のアミノ酸配列を有するペプチドである）をコードするDNAがpBTM116に挿入されているプラスミドを制限酵素XbaIで切断し、Doc2 α -MidをコードするDNA断片を単離し、これを発現ベクターpEF-BosのXbaI部位に正方向に挿入して連結する。

【0092】ラットMunc13-1-DidをコードするDNA断片が発現ベクターpEF-Bosに挿入されたプラスミドは以下のようにして構築した。実施例4で得られたMunc13-1-Did（アミノ酸残基番号851から1461）をコードするDNAがpGAD424に挿入されたプラスミドを制限酵素XbaIで切断し、Munc13-1-MidをコードするDNA断片を単離し、これを発現ベクターpEF-BosのXbaI部位に正方向に挿入して連結する。

【0093】PC12細胞を35mm dishで 5×10^5 となるように播き、10%牛胎児血清および5%馬血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で18時間培養した。その後、ヒトDoc2 α -Mid（アミノ酸残基番号13から37）またはラットMunc13-1-Did（アミノ酸残基番号851から1461）をコードするDNA断片を発現ベクターpEF-Bosに挿入したプラスミドのいずれか一方を、ヒト成長ホルモンを発現するプラスミドpXGH5と共に $1.5 \mu\text{g}$ のリポフェクタアミン（Gibco BRL社製）と1ml opti-MEM（Gibco BRL社製）を製造者の説明書に従って用いて、トランスフェクションした。トランスフェクションに用いたプラスミドの量は、それぞれ $2 \mu\text{g}$ である。いずれかのトランスフェクション細胞を4時間培養した後、培地交換を行い10%牛胎児血清および5%馬血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で48時間培養した。分泌刺激を与えた場合と、与えない場合のDoc2 α タンパク質とMunc13-1タンパク質の発現量を比較するために、上記実施例8と同様に高濃度カリウム処理またはTPA処理を行い、無処理のものをコントロールとした。分泌刺激後、細胞ペレットを回収し、 $500 \mu\text{l}$ の1% Triton-X-100含有PSSに懸濁して細胞内に残存する成長ホルモンを溶解した。培養上清および細胞溶解物に含まれる成長ホルモンの量を、抗ヒト成長ホルモン抗体を用いるラジオイムノアッセイ用の測定キット（Nichols Institute社製）を製造者の使用説明書に基づいて用いて測定した。得られた測定値をもとにして、産生された全成長ホルモン量に占める分泌された成長ホルモン量の割合を決定した。

【0094】結果を図7に示す。図7は、プラスミドを導入していないコントロールPC12細胞、Doc2 α -Midを発現させたPC12細胞および、Munc13-1-Didを発現させたPC12細胞を、それぞれ低濃度カリウムイオン（low K⁺）、高濃度カリウムイオン（high K⁺）、およびTPA処理した時の、全成長ホルモン量に対する分泌されたホルモン量の割合を百分率で示す。Doc2 α -MidとMunc13-1-Didは、い

ずれもPC12細胞での成長ホルモンの分泌に対して抑制作用を示した。ヒト成長ホルモンをPC12細胞で発現させると、ヒト成長ホルモンは、神経伝達物質の1つであるノルエピネフリンを含む分泌顆粒に輸送され、カルシウムイオン依存性の分泌によりノルエピネフリンとともに分泌されることが知られている。従って、成長ホルモンの分泌量は、カルシウムイオン依存性の分泌量を反映している。この結果から、Munc13-1のDidおよびDoc2 α のMidがいずれもカルシウム依存性分泌に影響をおよぼすことが明らかになった。

【0095】

【発明の効果】本発明によれば、Doc2 α とMunc13-1との結合のアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質のスクリーニング方法；神経伝達物質またはホルモンのカルシウムイオン依存性の分泌を阻害する方法；Doc2 α 類似体とキャリアタンパク質との融合タンパク質などが提供される。

【0096】本発明でDoc2 α とMunc13-1が結合することから、神経細胞または内分泌細胞における、神経伝達物質またはホルモンの、カルシウムイオン依存性の分泌機構の解明に新たな展開がもたらされる。

【0097】Doc2 α とMunc13-1は、いずれもC2領域を有しており、この領域にカルシウムイオンが結合することによりカルシウムイオンセンサーとして機能していると考えられる。PC12細胞を用いた成長ホルモンの分泌の実験から、Doc2 α とMunc13-1との結合がカルシウムイオン依存性分泌を調節していると予想される。以上のことから、Doc2 α とMunc13-1との結合を阻害する物質（アンタゴニスト）または促進する物質（アゴニスト）は、神経細胞における神経伝達物質放出機能を制御するために使用し得る。Doc2 α とMunc13-1との結合のアゴニストまたはアンタゴニストは、神経伝達物質またはカルシウムイオンが関与している神経疾患の治療薬（例えば、抗痴呆薬、抗てんかん薬、向精神薬、あるいは脳代謝改善薬）として使用することが可能である。

【0098】さらに、Doc2 α -Midはわずか25アミノ酸からなっているので、この25アミノ酸を化学合成して樹脂または96ウェルプレートに結合させ、次いでアゴニストまたはアンタゴニストの候補物質と共に、組み換え体タンパク質として作製、精製、および標識したMunc13-Didを加え、樹脂または96ウェルプレートに結合した標識を測定し、Munc13-DidとDoc2 α -Midとの結合が促進または阻害されたか否かを決定することにより、アゴニストおよびアンタゴニストを迅速にスクリーニングすることが可能である。

【0099】（参考文献）

- Orita, S., Sasaki, T., Naito, A., Komuro, R., Ohtsuka, T., Maeda, M., Suzuki, H., Igarashi, H., and Takei, Y., Doc2: a novel brain protein having two repeated C2-like domains. *Biochemical & Biophysical Res*

earch Communications, 1995. 206: p. 439-448.

2. 特開平8-16385
3. Orita, S., Sasaki, T., Komuro, R., Sakaguchi, G., Maeda, M., Igarashi, H., and Takai, Y., Doc2 enhances Ca^{2+} -dependent exocytosis from PC12 cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. 271: p. 7257-7260.
4. Sakaguchi, G., Orita, S., Maeda, M., Igarashi, H., and Takai, Y., Molecular cloning of an isoform of Doc2 having two C2-like domains. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1995. 217 p. 1053-1061.
5. Takai, Y., Kishimoto, A., Kikkawa, U., Mori, T., and Nishizuka, Y., Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1979. 91: p. 1218-1224.
6. Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawahara, Y., Mori, T., and Nishizuka, Y., Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 1979. 254: p. 3692-3695.
7. Nishizuka, Y., The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 1988. 334: p. 661-665
8. Clark, J. D., Lin, L. L., Kriz, R. W., Ramesha, C. S., Sultzman, L. A., Lin, A. Y., Milona, N., and Knopf, J. L., *Cell*, 1991. 65: p. 1043-1051.
9. Stahl, M. L., Ferenz, C. R., Kelleher, K. L., Kriz, R. W., and Knopf, J. L., Sequence similarity of phospholipase C with the non-catalytic region of src. *Nature*, 1988. 332: p. 269-272.
10. Maruyama, I. N. and Brenner, S., A phorbol ester/diacylglycerol-binding protein encoded by the unc-13 gene of *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991. 88: p. 5729-5733.
11. Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y., and Sudhof, T. C., Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270: p. 25273-25280.
12. Perin, M. S., Fried, V. A., Mignery, G. A., Jahn, R., and Sudhof, T. C., Phospholipid binding by a synaptosomal protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature*, 1990. 345: p. 260-263.
13. Shirataki, H., Kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M., and Takai, Y., Rabphilin-3A, a putative target protein for small G p25A/rab3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. *Molecular & Cellular Biology*, 1993. 13: p. 2061-2068.
14. Ahmed, S., Maruyama, I. N., Kozma, R., Lee, J., Brenner, S., and Lim, L., The *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene product is a phospholipid-dependent high-affinity phorbol ester receptor. *Biochemical Journal*, 1992. 287(Pt 3): p. 995-999.
15. Kazanietz, M. G., Lewin, N. E., Bruns, J. D., and Blumberg, P. M., Characterization of the cysteine-rich region of the *Caenorhabditis elegans* protein Unc-13 as a high affinity phorbol ester receptor. Analysis of ligand-binding interactions, lipid cofactor requirements, and inhibitor sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. 270(18): p. 10777-10783.
16. Hosono, R. and Kamiya, Y. *Neuroscience Letter* 1991. 128:243-244
17. Vojtek, A. B., Hollenberg, S. M., and Cooper, J. A., Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, 1993. 74 p. 205-214.
18. Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A., and Schiestl, R. H., Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Research*, 1992. 20: p. 1425.
19. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R., DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1977. 74: p. 5463-5467.
20. Sambrook, F., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
21. Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P., *Methods in Yeast Genetics*. 1990, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
22. Wakade, T. D., Bhave, S. V., Bhave, A. S., Malhotra, R. K., and Wakade, A. R., *Journal of Biological Chemistry*, 1991. 266: p. 6424-6428.

【0100】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 611

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類: ペプチド

起源

生物名: ラット

* 他の情報: この配列は、Munc13-1の851～1461位のアミノ酸配列に相当する

*

配列:

Glu	Lys	Val	Ala	Pro	Tyr	His	Val	Gln	Tyr	Thr	Cys	Leu	His	Glu	Asn	
1															15	
Leu	Phe	His	Phe	Val	Thr	Asp	Val	Gln	Asn	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Ile	
	20											25		30		
Pro	Asp	Ala	Lys	Gly	Asp	Asp	Ala	Trp	Lys	Val	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Thr	
												35		40	45	
Ala	Gln	Glu	Ile	Val	Asp	Glu	Phe	Ala	Met	Arg	Tyr	Gly	Val	Glu	Ser	
												50		55	60	
Ile	Tyr	Gln	Ala	Met	Thr	His	Phe	Ala	Cys	Leu	Ser	Ser	Lys	Tyr	Met	
	65											70		75	80	
Cys	Pro	Gly	Val	Pro	Ala	Val	Met	Ser	Thr	Leu	Leu	Ala	Asn	Ile	Asn	
												85		90	95	
Ala	Tyr	Tyr	Ala	His	Thr	Thr	Ala	Ser	Thr	Asn	Val	Ser	Ala	Ser	Asp	
												100		105	110	
Arg	Phe	Ala	Ala	Ser	Asn	Phe	Gly	Lys	Glu	Arg	Phe	Val	Lys	Leu	Leu	
												115		120	125	
Asp	Gln	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Arg	Ile	Asp	Leu	Ser	Met	Tyr	Arg	Asn	
												130		135	140	
Asn	Phe	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Glu	Arg	Leu	Gln	Asp	Leu	Lys	Ser	Thr	
	145											150		155	160	
Val	Asp	Leu	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Phe	Phe	Arg	Met	Lys	Val	Gln	Glu	
												165		170	175	
Leu	Gln	Ser	Pro	Pro	Arg	Ala	Ser	Gln	Val	Val	Lys	Asp	Cys	Val	Lys	
												180		185	190	
Ala	Cys	Leu	Asn	Ser	Thr	Tyr	Glu	Tyr	Ile	Phe	Asn	Asn	Cys	His	Glu	
												195		200	205	
Leu	Tyr	Gly	Arg	Glu	Tyr	Gln	Thr	Asp	Pro	Ala	Lys	Lys	Gly	Glu	Val	
												210		215	220	
Pro	Pro	Glu	Glu	Gln	Gly	Pro	Ser	Ile	Lys	Asn	Leu	Asp	Phe	Trp	Ser	
												225		230	235	
Lys	Leu	Ile	Thr	Leu	Ile	Val	Ser	Ile	Ile	Glu	Glu	Asp	Lys	Asn	Ser	
												245		250	255	
Tyr	Thr	Pro	Cys	Leu	Asn	Gln	Phe	Pro	Gln	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Lys	
												260		265	270	
Ile	Ser	Ala	Glu	Val	Met	Trp	Ser	Leu	Phe	Ala	Gln	Asp	Met	Lys	Tyr	
												275		280	285	
Ala	Met	Glu	Glu	His	Asp	Lys	His	Arg	Leu	Cys	Lys	Ser	Ala	Asp	Tyr	
												290		295	300	
Met	Asn	Leu	His	Phe	Lys	Val	Lys	Trp	Leu	Tyr	Asn	Glu	Tyr	Val	Ala	
												305		310	315	
Glu	Leu	Pro	Thr	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Pro	Glu	Tyr	Tyr	Pro	Ala	Trp	Phe
												325		330	335	
Glu	Pro	Phe	Val	Ile	Gln	Trp	Leu	Asp	Glu	Asn	Glu	Glu	Val	Ser	Arg	
												340		345	350	
Asp	Phe	Leu	His	Gly	Ala	Leu	Glu	Arg	Asp	Lys	Lys	Asp	Gly	Phe	Gln	
												355		360	365	

29

30

Gln Thr Ser Glu His Ala Leu Phe Ser Cys Ser Val Val Asp Val Phe
 370 375 380
 Ser Gln Leu Asn Gln Ser Phe Glu Ile Ile Lys Lys Leu Glu Cys Pro
 385 390 395 400
 Asp Pro Gln Ile Val Gly His Tyr Met Arg Arg Phe Ala Lys Thr Ile
 405 410 415
 Ser Asn Val Leu Leu Gln Tyr Ala Asp Ile Val Ser Lys Asp Phe Ala
 420 425 430
 Ser Tyr Cys Ser Lys Glu Lys Glu Lys Val Pro Cys Ile Leu Met Asn
 435 440 445
 Asn Thr Gln Gln Leu Arg Val Gln Leu Glu Lys Met Phe Glu Ala Met
 450 455 460
 Gly Gly Lys Glu Leu Asp Ala Glu Ala Ser Gly Thr Leu Lys Glu Leu
 465 470 475 480
 Gln Val Lys Leu Asn Asn Val Leu Asp Glu Leu Ser His Val Phe Ala
 485 490 495
 Thr Ser Phe Gln Pro His Ile Glu Glu Cys Val Arg Gln Met Gly Asp
 500 505 510
 Ile Leu Ser Gln Val Lys Gly Thr Gly Asn Val Pro Ala Ser Ala Cys
 515 520 525
 Ser Ser Val Ala Gln Asp Ala Asp Asn Val Leu Gln Pro Ile Met Asp
 530 535 540
 Leu Leu Asp Ser Asn Leu Thr Leu Phe Ala Lys Ile Cys Glu Lys Thr
 545 550 555 560
 Val Leu Lys Arg Val Leu Lys Glu Leu Trp Lys Leu Val Met Asn Thr
 565 570 575
 Met Glu Arg Thr Ile Val Leu Pro Pro Leu Thr Asp Gln Thr Met Ile
 580 585 590
 Gly Thr Leu Leu Arg Lys His Gly Lys Gly Leu Glu Lys Gly Arg Val
 595 600 605
 Lys Leu Pro
 610

【0101】配列番号：2

配列の長さ：1718

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

* 起源

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：125..1324

* 特徴を決定した方法：S

配列

CCACGCGTCC GGTCTCTGACG GCGCTGGAGC TGA
 GGGGCAG TGC GGATGCC CCAGGAAGGC 60
 TCCTAGGAAG AGGGGACCCA CGGTGACTTC CTA
 AGGAAGC GCGGTTCCCA GCCAGGGGTG 120
 CTGC ATG AGG GGC CGC AGG GGC GAT CGC
 ATG ACC ATC AAC ATC CAG GAG 169
 Met Arg Gly Arg Arg Gly Asp Arg
 Met Thr Ile Asn Ile Gln Glu
 1 5
 10 15
 CAC ATG GCC ATC AAC GTG TGC CCC GGG

31

32

CCC	ATC	CGG	CCC	ATC	CGC	CAG		217
His	Met	Ala	Ile	Asn	Val	Cys	Pro	Gly
Pro	Ile	Arg	Pro	Ile	Arg	Gln		
20								
25								
ATC	TCT	GAC	TAC	TTC	CCC	CGG	GGA	CCA
GGA	CCT	GAA	GGG	GGC	GGC	GGG		265
Ile	Ser	Asp	Tyr	Phe	Pro	Arg	Gly	Pro
Gly	Pro	Glu	Gly	Gly	Gly	Gly		
35								
40								
AGC	GGC	GGG	GAG	GCC	CCC	GCC	CAT	CTG
GTC	CCC	CTG	GCT	CTG	GCC	CCC		313
Ser	Gly	Gly	Glu	Ala	Pro	Ala	His	Leu
Val	Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Pro		
50								
55								
CCT	GCA	GCC	CTC	CTT	GGG	GCC	ACC	ACG
CCT	GAG	GAT	GGT	GCG	GAG	GTG		361
Pro	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Ala	Thr	Thr
Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Glu	Val		
65								
70								
75								
GAC	AGC	TAT	GAC	TCG	GAT	GAT	GCC	ACC
GCC	CTA	GGC	AAG	CTG	GAG	TTT		409
Asp	Ser	Tyr	Asp	Ser	Asp	Asp	Ala	Thr
Ala	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Phe		
80								
85								
90								
95								
GAC	CTT	CTC	TAC	GAC	CGG	GCC	TCC	TGC
ACT	CTG	CAC	GTA	TGC	ATC	CTC		457
Asp	Leu	Leu	Tyr	Asp	Arg	Ala	Ser	Cys
Thr	Leu	His	Val	Cys	Ile	Leu		
100								
105								
AGG	GCC	AAG	GGC	CTC	AAG	CCC	ATG	GAT
TTC	AAT	GGC	CTC	GCC	GAC	CCC		505
Arg	Ala	Lys	Gly	Leu	Lys	Pro	Met	Asp
Phe	Asn	Gly	Leu	Ala	Asp	Pro		
115								
120								
125								
TAC	GTC	AAG	CTG	CAC	TTG	CTG	CCT	GGA
GCC	TGT	AAG	GCC	AAT	AAG	CTA		553
Tyr	Val	Lys	Leu	His	Leu	Leu	Pro	Gly
Ala	Cys	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu		
130								
135								
140								
AAA	ACG	AAG	ACT	CAG	AGG	AAC	ACA	CTG
AAT	CCC	GTG	TGG	AAT	GAG	GAC		601
Lys	Thr	Lys	Thr	Gln	Arg	Asn	Thr	Leu

33

34

A s n	P r o	V a l	T r p	A s n	G l u	A s p		
1 4 5					1 5 0			
1 5 5								
C T G	A C T	T A C	A G C	G G G	A T C	A C A	G A T	G A C
G A C	A T C	A C G	C A C	A A G	G T G	C T C		6 4 9
L e u	T h r	T y r	S e r	G l y	I l e	T h r	A s p	A s p
A s p	I l e	T h r	H i s	L y s	V a l	L e u		
1 6 0					1 6 5			
1 7 0							1 7 5	
A G G	A T C	G C C	G T C	T G T	G A T	G A G	G A C	A A G
C T G	A G T	C A C	A A T	G A G	T T T	A T T		6 9 7
A r g	I l e	A l a	V a l	C y s	A s p	G l u	A s p	L y s
L e u	S e r	H i s	A s n	G l u	P h e	I l e		
1 8 0								
1 8 5					1 9 0			
G G G	G A G	A T C	C G C	G T G	C C C	C T C	C G C	C G C
C T C	A A G	C C T	T C G	C A G	A A G	A A G		7 4 5
G l y	G l u	I l e	A r g	V a l	P r o	L e u	A r g	A r g
L e u	L y s	P r o	S e r	G l n	L y s	L y s		
1 9 5							2 0 0	
2 0 5								
C A T	T T T	A A C	A T C	T G C	C T C	G A G	C G C	C A A
G T C	C C G	C T G	G C G	T C C	C C C	T C T		7 9 3
H i s	P h e	A s n	I l e	C y s	L e u	G l u	A r g	G l n
V a l	P r o	L e u	A l a	S e r	P r o	S e r		
2 1 0							2 1 5	
2 2 0								
T C C	A T G	T C A	G C G	G C G	C T G	A G G	G G C	A T C
T C C	T G T	T A T	C T G	A A G	G A C	T T G		8 4 1
S e r	M e t	S e r	A l a	A l a	L e u	A r g	G l y	I l e
S e r	C y s	T y r	L e u	L y s	A s p	L e u		
2 2 5							2 3 0	
2 3 5								
G A G	C A G	G C G	G A G	C A G	G G G	C A G	G G G	C T G
C T G	G A G	G A G	C G T	G G C	C G C	A T C		8 8 9
G l u	G l n	A l a	G l u	G l n	G l y	G l n	G l y	L e u
L e u	G l u	G l u	A r g	G l y	A r g	I l e		
2 4 0							2 4 5	
2 5 0							2 5 5	
C T G	C T G	A G T	C T C	A G C	T A C	A G C	T C G	C G G
C G C	C G G	G G A	C T G	C T G	G T A	G G C		9 3 7
L e u	L e u	S e r	L e u	S e r	T y r	S e r	S e r	A r g
A r g	A r g	G l y	L e u	L e u	V a l	G l y		
2 6 0								
2 6 5							2 7 0	
A T C	T T G	C G C	T G C	G C C	C A T	C T G	G C T	G C C
A T G	G A C	G T C	A A C	G G T	T A C	T C G		9 8 5
I l e	L e u	A r g	C y s	A l a	H i s	L e u	A l a	A l a
M e t	A s p	V a l	A s n	G l y	T y r	S e r		
2 7 5							2 8 0	

285

GAC	CCC	TAC	GTC	AAG	ACG	TAC	CTG	AGG
CCC	GAT	GTG	GAC	AAG	AAA	TCC		1033
Asp	Pro	Tyr	Val	Lys	Thr	Tyr	Leu	Arg
Pro	Asp	Val	Asp	Lys	Lys	Ser		

290

295

300

AAG	CAT	AAG	ACG	TGT	GTG	AAG	AAG	AAG
ACT	CTC	AAC	CCA	GAA	TTT	AAC		1081
Lys	His	Lys	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Lys
Thr	Leu	Asn	Pro	Glu	Phe	Asn		

305

310

315

GAG	GAG	TTT	TTC	TAC	GAG	ATA	GAG	CTC
TCC	ACT	CTG	GCC	ACC	AAG	ACC		1129
Glu	Glu	Phe	Phe	Tyr	Glu	Ile	Glu	Leu
Ser	Thr	Leu	Ala	Thr	Lys	Thr		

320

325

330

335

CTG	GAA	GTC	ACC	GTC	TGG	GAC	TAT	GAC
ATT	GGC	AAA	TCC	AAT	GAC	TTC		1177
Leu	Glu	Val	Thr	Val	Trp	Asp	Tyr	Asp
Ile	Gly	Lys	Ser	Asn	Asp	Phe		

320

325

345

350

ATT	GGT	GGC	GTG	TCC	CTG	GGG	CCA	GGT
GCC	CGA	GGC	GAG	GCT	CGG	AAG		1225
Ile	Gly	Gly	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Gly
Ala	Arg	Gly	Glu	Ala	Arg	Lys		

340

340

355

355

CAC	TGG	AGT	GAC	TGC	CTG	CAG	CAG	CGG
GAC	GCA	GCC	CTG	GAG	CGC	TGG		1273
His	Trp	Ser	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Arg
Asp	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Trp		

370

375

365

CAC	ACC	CTG	ACC	AGT	GAG	CTG	CCC	CCT
GCG	GCC	GGG	GCT	CTG	TCC	TCA		1321
His	Thr	Leu	Thr	Ser	Glu	Leu	Pro	Pro
Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ser	Ser		

385

390

395

GCC	TGAGTGGACA	GCAGTGTCCC	GGCACAGGCC	
	CATCGAGCCG	GGTCCAGTAC		1374

Ala

400

CCAACCTTCG	CACGAGTGTG	TTGCACGTTT	ACA	
CAGGTGG	GCTGCCAC	CCTGCACTAC		1434
CTATTTGTG	AGTCTCGTGA	CCCGGGTCTG	TCT	

37

38

GCTCATG	AGGGGCTGCG	GAGTTCTATA	1494
TTCACATATG	CAAACCTCCT	GCCTGACTCG	CTA
GTCCCTG	CAAATATGCA	AACCCCCCTA	1554
CTACTGCACA	CCCGGGCAGT	GCTCAGAGCC	GCC
CAGGCC	CGCGCTCCTC	ACTCCTGCCT	1614
CTCCACGCTG	CCCCGTCCT	CTCCCCAAC	AGG
GAGGAGG	TCGGATTAGG	GAGGTTTCAGA	1674
GGAGGAGAAT	GTCTCAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAA
AAAAAAA	AAAAA		1718

【0102】配列番号：3

配列の長さ：25

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

* 起源

生物名：ヒト

他の情報：この配列は、Doc2 α の13～37位のアミノ酸配列に相当する

*

配列：

Ile	Gln	Glu	His	Met	Ala	Ile	Asn	Val	Cys	Pro	Gly	Pro	Ile	Arg	Pro
1					5					10			15		
Ile	Arg	Gln	Ile	Ser	Asp	Tyr	Phe	Pro							
			20					25							

【0103】配列番号：4

配列の長さ：5318

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

※ 起源

生物名：ラット

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：30..5315

※ 特徴を決定した方法：S

配列

GTATTGAAGT	GGGAAATGGA	GGGTCGGGG	ATG	AAG	CGA	CAT	GGC	CGG	CGA	CCG					50	
							Met	Lys	Arg	His	Gly	Arg	Arg	Pro		
							1		5							
GGC	CCC	AGC	GTA	AGC	TCT	GAG	CCC	CGC	GCT	GCG	CCC	GCC	GCG	CTC	98	
							Gly	Pro	Ser	Val	Ser	Ser	Glu	Pro		
							10		15				20			
CCG	CCT	GGA	GTC	ATG	TCT	CTG	CTG	TGC	GTG	GGA	GTC	AAA	AAA	GCC	146	
							Pro	Pro	Gly	Val	Met	Ser	Leu	Leu		
							25		30		35		40			
TTT	GAC	GGT	GCC	CAA	GAG	AAG	TTC	AAC	ACA	TAC	GTG	ACG	CTG	AAG	GTG	194
							Phe	Asp	Gly	Ala	Gln	Glu	Lys	Phe		
							45		50			55				
CAG	AAC	GTG	AAG	AGC	ACT	ACC	ATA	GCT	GTA	CGC	GGC	AGC	CAG	CCT	AGC	242
							Gln	Asn	Val	Lys	Ser	Thr	Thr	Ile	Ala	
							60		65			70				
TGG	GAG	CAG	GAC	TTC	ATG	TTT	GAG	ATC	AAC	CGC	CTG	GAT	CTG	GGC	CTG	290
							Trp	Glu	Gln	Asp	Phe	Met	Phe	Glu	Ile	
							75		80			85				
ACG	GTG	GAG	GTG	TGG	AAC	AAG	GGT	CTC	ATC	TGG	GAC	ACA	ATG	GTG	GGT	338
							Thr	Val	Glu	Val	Trp	Asn	Lys	Gly	Ile	
							90		95			100				
ACT	GTG	TCG	ATC	CCA	CTT	CGG	ACC	ATC	CGT	CAG	TCC	AAT	GAG	GAG	GGT	386
							Thr	Val	Trp	Ile	Pro	Leu	Arg	Thr		
							105		110			115		120		

39	40	
CCG GGA GAA TGG CTG ACA CTG GAC TCT CAG GCC ATC ATG GCG GAC AGT		434
Pro Gly Glu Trp Leu Thr Leu Asp Ser Gln Ala Ile Met Ala Asp Ser		
125 130 135		
GAG ATC TGT GGG ACC AAG GAC CCC ACC TTC CAC CGC ATC CTC CTG GAC		482
Glu Ile Cys Gly Thr Lys Asp Pro Thr Phe His Arg Ile Leu Leu Asp		
140 145 150		
GCA CAT TTT GAG CTG CCT TTG GAC ATC CCC GAG GAG GCG CGC TAC		530
Ala His Phe Glu Leu Pro Leu Asp Ile Pro Glu Glu Ala Arg Tyr		
155 160 165		
TGG GCC AAG AAG CTG GAG CAG CTG AAT GCC ATG CGT GAC CAA GAT GAG		578
Trp Ala Lys Lys Leu Glu Gln Leu Asn Ala Met Arg Asp Gln Asp Glu		
170 175 180		
TAC TCC TTT CAG GAC CAG CAG GAC AAG CCA CTG CCG GTG CCC AGC AGC		626
Tyr Ser Phe Gln Asp Gln Gln Asp Lys Pro Leu Pro Val Pro Ser Ser		
185 190 195 200		
CAG TGC TGC AAC TGG AAT TAC TTT GGC TGG GGA GAA CAG AAT GAT GAT		674
Gln Cys Cys Asn Trp Asn Tyr Phe Gly Trp Gly Glu Gln Asn Asp Asp		
205 210 215		
CCC GAC AGT GCC GTG GAT GAC CGG GAC AGT GAT TAT AGG AGT GAG ACG		722
Pro Asp Ser Ala Val Asp Asp Arg Asp Ser Asp Tyr Arg Ser Glu Thr		
220 225 230		
AGC AAC AGC ATC CCA CCG CCT TAC TAC ACG ACT TCG CAG CCC AAT GCT		770
Ser Asn Ser Ile Pro Pro Pro Tyr Tyr Thr Thr Ser Gln Pro Asn Ala		
235 240 245		
TCG GTG CAC CAG TAC TCC GTG CGG CCA CCC CCT CTG GGG TCC CGG GAG		818
Ser Val His Gln Tyr Ser Val Arg Pro Pro Leu Gly Ser Arg Glu		
250 255 260		
TCC TAC AGC GAC TCC ATG CAC AGC TAT GAA GAG TTC TCT GAG CCG CGG		866
Ser Tyr Ser Asp Ser Met His Ser Tyr Glu Glu Phe Ser Glu Pro Arg		
265 270 275 280		
GCA CTC AGT CCC ACA GGC AGC AGC CGC TAT GCT TCC AGT GGG GAG CTG		914
Ala Leu Ser Pro Thr Gly Ser Ser Arg Tyr Ala Ser Ser Gly Glu Leu		
285 290 295		
AGC CAG GGC AGC TCC CAG CTG AGT GAG GAC TTC GAC CCG GAT GAG CAC		962
Ser Gln Gly Ser Ser Gln Leu Ser Glu Asp Phe Asp Pro Asp Glu His		
300 305 310		
AGC CTA CAG GGC TCA GAG CTG GAT GAC GAG AGG GAC CGA GAT TCT TAT		1010
Ser Leu Gln Gly Ser Glu Leu Asp Asp Glu Arg Asp Arg Asp Ser Tyr		
315 320 325		
CAC TCC TGC CAC AGC TCT GTG AGC TAC CAC AAG GAC TCA CCC CGC TGG		1058
His Ser Cys His Ser Ser Val Ser Tyr His Lys Asp Ser Pro Arg Trp		
330 335 340		
GAC CAG GAT GAG GAG GAC CTG GAG GAC CTG GAG GAC CTG GAA GAT GAG		1106
Asp Gln Asp Glu Glu Asp Leu Glu Asp Leu Glu Asp Leu Glu Asp Glu		
345 350 355 360		
GAG TTG CCC GAG GAA GAG GAG TTG GAA GAG GAG GAG TTG GAG GAG GAG		1154
Glu Leu Pro Glu Glu Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Glu Glu Glu		
365 370 375		
GAG GAG TTG GAG GAA GAG GAA TTG GAG TTG GAG GAG GAG GAG GAG GTG		1202
Glu Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val		

41

42

380	385	390	
CCT GAT GAC CTG GCC AGC TAT ACC CAG CAG GAG GAC ACC ACT GTG GCT			1250
Pro Asp Asp Leu Ala Ser Tyr Thr Gln Gln Glu Asp Thr Thr Val Ala			
395	400	405	
GAG CCC AAA GAG TTC AAG CGG ATC AGC TTC CCA ACA GCT GCA CCT CAG			1298
Glu Pro Lys Glu Phe Lys Arg Ile Ser Phe Pro Thr Ala Ala Pro Gln			
410	415	420	
AAG GAA GAC AAA GTT TCA GCT GTG CCC ATT GAG GCC CCC GAT GTG TCC			1346
Lys Glu Asp Lys Val Ser Ala Val Pro Ile Glu Ala Pro Asp Val Ser			
425	430	435	440
AAA GGC ATC CCC AAG GCA GCC ACA CCT GAA GAG AAG GCA GCT GCG GAG			1394
Lys Gly Ile Pro Lys Ala Ala Thr Pro Glu Glu Lys Ala Ala Ala Glu			
445	450	455	
TGT GCA CAG GAA GCG GAG CCC CCC AAG TCT GAG GAG AGT TTC AGA TCT			1442
Cys Ala Gln Glu Ala Glu Pro Pro Lys Ser Glu Glu Ser Phe Arg Ser			
460	465	470	
CGA GAG GCT GAG GAG GGC CAG GAA GGG CAG GAT GCC ATG TCC AGG GCC			1490
Arg Glu Ala Glu Glu Gly Gln Glu Gly Gln Asp Ala Met Ser Arg Ala			
475	480	485	
AAA GCC AAC TGG TTG CGA GCC TTC AAC AAG GTG CGC ATG CAG CTG CAG			1538
Lys Ala Asn Trp Leu Arg Ala Phe Asn Lys Val Arg Met Gln Leu Gln			
490	495	500	
GAG GCC CGA GGA GAA GGA GAG ATG TCC AAG TCT CTG TGG TTC AAA GGC			1586
Glu Ala Arg Gly Glu Gly Glu Met Ser Lys Ser Leu Trp Phe Lys Gly			
505	510	515	520
GGC CCT GGT GGT GGC CTT ATC ATC ATT GAC AGC ATG CCA GAC ATC AGG			1634
Gly Pro Gly Gly Leu Ile Ile Asp Ser Met Pro Asp Ile Arg			
525	530	535	
AAG CGG AAG CCC ATT CCC CTC GTG AGC GAC CTG GCT ATG TCT CTG GTC			1682
Lys Arg Lys Pro Ile Pro Leu Val Ser Asp Leu Ala Met Ser Leu Val			
540	545	550	
CAG TCA CGG AAG GCG GGC ATC ACC TCG GCC TTG GCC TCC AGC ACG TTG			1730
Gln Ser Arg Lys Ala Gly Ile Thr Ser Ala Leu Ala Ser Ser Thr Leu			
555	560	565	
AAC AAT GAA GAG TTG AAA AAC CAC GTT TAC AAG AAG ACC CTG CAA GCC			1778
Asn Asn Glu Glu Leu Lys Asn His Val Tyr Lys Lys Thr Leu Gln Ala			
570	575	580	
TTA ATC TAC CCC ATC TCC TGC ACC ACG CCG CAC AAC TTC GAG GTG TGG			1826
Leu Ile Tyr Pro Ile Ser Cys Thr Thr Pro His Asn Phe Glu Val Trp			
585	590	595	600
ACG GCC ACC ACT CCC ACC TAC TGC TAC GAG TGC GAG GGG CTG CTG TGG			1874
Thr Ala Thr Thr Pro Thr Tyr Cys Tyr Glu Cys Glu Gly Leu Leu Trp			
605	610	615	
GGC ATC GCG CGG CAG GGC ATG CGC TGC ACC GAG TGC GGC GTT AAG TGC			1922
Gly Ile Ala Arg Gln Gly Met Arg Cys Thr Glu Cys Gly Val Lys Cys			
620	625	630	
CAC GAG AAG TGC CAA GAC CTG CTC AAC GCG GAC TGC CTG CAG CGG GCG			1970
His Glu Lys Cys Gln Asp Leu Leu Asn Ala Asp Cys Leu Gln Arg Ala			
635	640	645	
GCT GAG AAG AGT TCT AAG CAT GGC GCT GAA GAC CGC ACG CAG AAC ATC			2018

43

44

Ala Glu Lys Ser Ser Lys His Gly Ala Glu Asp Arg Thr Gln Asn Ile			
650	655	660	
ATC ATG GTG CTG AAG GAC CGC ATG AAG ATC CGC GAG CGC AAC AAG CCT			2066
Ile Met Val Leu Lys Asp Arg Met Lys Ile Arg Glu Arg Asn Lys Pro			
665	670	675	680
GAG ATC AGC TGA TCC AGG AGG TCT TCG CGG TCA CCA AGA GCG CAT TCG			2114
Glu Ile Phe Glu Leu Ile Gln Glu Val Phe Ala Val Thr Lys Ser Ala			
685	690	695	
CAC ACA CAG CAG ATG AAG GCC GTC AAG CAG AGT GTG CTG GAT GGC ACA			2162
His Thr Gln Gln Met Lys Ala Val Lys Gln Ser Val Leu Asp Gly Thr			
700	705	710	
TCC AAG TGG TCT GCC AAA ATT AGC ATC ACG GTG GTC TGT GCC CAG GGC			2210
Ser Lys Trp Ser Ala Lys Ile Ser Ile Thr Val Val Cys Ala Gln Gly			
715	720	725	
TTG CAG GCC AAG GAC AAG ACA GGA TCC AGT GAC CCT TAT GTC ACC GTC			2258
Leu Gln Ala Lys Asp Lys Thr Gly Ser Ser Asp Pro Tyr Val Thr Val			
730	735	740	
CAG GAC CAA GAA AAG GAC AAA AAC CAT CTA CGG GAA CCT TTT GGG AAG			2306
Gln Val Gly Lys Thr Lys Lys Arg Thr Lys Thr Ile Tyr Gly Asn Leu			
745	750	755	760
AAC CCA GTG TGG GAA GAG AAT TTC CAC TTT GAA TGT CAC AAC TCC TCT			2354
Asn Pro Val Trp Glu Glu Asn Phe His Phe Glu Cys His Asn Ser Ser			
765	770	775	
GAC CGG ATC AAG GTG CGT GTG TTG GAT GAA GAC GAT GAC ATC AAA TCC			2402
Asp Arg Ile Lys Val Arg Val Leu Asp Glu Asp Asp Asp Ile Lys Ser			
780	785	790	
CGT GTG AAG CAA AGG TTT AAG AGG GAG TCT GAT GAC TTC CTA GGG CAG			2450
Arg Val Lys Gln Arg Phe Lys Arg Glu Ser Asp Asp Phe Leu Gly Gln			
795	800	805	
ACA ATC ATC GAG GTG CGG ACG CTT AGC GCC GAG ATG GAT GTG TGG TAC			2498
Thr Ile Ile Glu Val Arg Thr Leu Ser Gly Glu Met Asp Val Trp Tyr			
810	815	820	
AAT CTG GAC AAG AGA ACA GAC AAG TCT GCT GTG TCG GGC GCC ATT CGG			2546
Asn Leu Asp Lys Arg Thr Asp Lys Ser Ala Val Ser Gly Ala Ile Arg			
825	830	835	840
CTT CAC ATC AGT GTG GAG ATC AAA GGG GAG GAG AAG GTG GCA CCC TAC			2594
Leu His Ile Ser Val Glu Ile Lys Gly Glu Glu Lys Val Ala Pro Tyr			
845	850	855	
CAT GTC CAG TAC ACC TGT CTG CAT GAG AAC CTG TTC CAT TTT GTG ACG			2642
His Val Gln Tyr Thr Cys Leu His Glu Asn Leu Phe His Phe Val Thr			
860	865	870	
GAT GTA CAG AAC AAT GGC GTG GTG AAG ATT CCC GAT GCC AAA GGT GAC			2690
Asp Val Gln Asn Asn Gly Val Val Lys Ile Pro Asp Ala Lys Gly Asp			
875	880	885	
GAC GCC TGG AAG GTT TAC TAT GAT GAG ACT GCC CAG GAG ATC GTG GAT			2738
Asp Ala Trp Lys Val Tyr Tyr Asp Glu Thr Ala Gln Glu Ile Val Asp			
890	895	900	
GAG TTT GCC ATG CGC TAT GGC GTT GAA TCC ATC TAC CAA GCC ATG ACC			2786
Glu Phe Ala Met Arg Tyr Gly Val Glu Ser Ile Tyr Gln Ala Met Thr			
905	910	915	920

45	46	
CAC TTT GCC TGC CTC TCC TCC AAG TAC ATG TGC CCT GGG GTA CCC GCT		2834
His Phe Ala Cys Leu Ser Ser Lys Tyr Met Cys Pro Gly Val Pro Ala		
925 930 935		
GTC ATG AGC ACC CTG CTT GCC AAC ATC AAC GCC TAC TAC GCA CAC ACC		2882
Val Met Ser Thr Leu Leu Ala Asn Ile Asn Ala Tyr Tyr Ala His Thr		
940 945 950		
ACC GCC TCC ACC AAC GTG TCT GCC TCC GAC CGC TTC GCT GCC TCC AAT		2930
Thr Ala Ser Thr Asn Val Ser Ala Ser Asp Arg Phe Ala Ala Ser Asn		
955 960 965		
TTC GGG AAA GAG CGC TTT GTG AAA CTT CTG GAC CAG CTG CAC AAC TCC		2978
Phe Gly Lys Glu Arg Phe Val Lys Leu Leu Asp Gln Leu His Asn Ser		
970 975 980		
CTG CGG ATT GAC CTG TCC ATG TAC CGG AAC AAC TTC CCG GCC AGC AGC		3026
Leu Arg Ile Asp Leu Ser Met Tyr Arg Asn Asn Phe Pro Ala Ser Ser		
985 990 995 1000		
CCC GAG CGG CTG CAG GAT CTC AAG TCC ACA GTG GAC CTG CTT ACC AGC		3074
Pro Glu Arg Leu Gln Asp Leu Lys Ser Thr Val Asp Leu Leu Thr Ser		
1005 1010 1015		
ATC ACC TTC TTC CGG ATG AAG GTT CAG GAA CTG CAG AGT CCG CCA CGT		3122
Ile Thr Phe Phe Arg Met Lys Val Gln Glu Leu Gln Ser Pro Pro Arg		
1020 1025 1030		
GCC AGT CAG GTG GTG AAG GAC TGC GTG AAG GCG TGC CTC AAC TCC ACC		3170
Ala Ser Gln Val Val Lys Asp Cys Val Lys Ala Cys Leu Asn Ser Thr		
1035 1040 1045		
TAC GAG TAC ATC TTC AAC AAC TGT CAT GAG CTC TAT GGC CGG GAG TAC		3218
Tyr Glu Tyr Ile Phe Asn Asn Cys His Glu Leu Tyr Gly Arg Glu Tyr		
1050 1055 1060		
CAG ACA GAC CGG GCC AAG AAG GGG GAG GTC CCC CCG GAG GAG CAA GGC		3266
Gln Thr Asp Pro Ala Lys Lys Gly Glu Val Pro Pro Glu Glu Gln Gly		
1065 1070 1075 1080		
CCT AGC ATC AAG AAC CTG GAT TTC TGG TCC AAG CTC ATC ACC CTC ATC		3314
Pro Ser Ile Lys Asn Leu Asp Phe Trp Ser Lys Leu Ile Thr Leu Ile		
1085 1090 1095		
GTG TCT ATC ATT GAG GAG GAT AAG AAC TCC TAC ACA CCC TGC CTC AAT		3362
Val Ser Ile Ile Glu Asp Lys Asn Ser Tyr Thr Pro Cys Leu Asn		
1100 1105 1110		
CAG TTT CCC CAG GAG CTG AAT GTG GGG AAG ATC AGT GCT GAG GTG ATG		3410
Gln Phe Pro Gln Glu Leu Asn Val Gly Lys Ile Ser Ala Glu Val Met		
1115 1120 1125		
TGG AGC CTG TTT GCC CAG GAC ATG AAG TAC GCC ATG GAG GAA CAC GAC		3458
Trp Ser Leu Phe Ala Gln Asp Met Lys Tyr Ala Met Glu Glu His Asp		
1130 1135 1140		
AAG CAC CGG CTG TGT AAG AGC GCA GAC TAC ATG AAC CTG CAT TTC AAG		3506
Lys His Arg Leu Cys Lys Ser Ala Asp Tyr Met Asn Leu His Phe Lys		
1145 1150 1155 1160		
GTC AAG TGG TTG TAC AAC GAG TAC GTG GCT GAA CTG CCC ACC TTC AAG		3554
Val Lys Trp Leu Tyr Asn Glu Tyr Val Ala Glu Leu Pro Thr Phe Lys		
1165 1170 1175		
GAC CGC GTG CCG GAG TAC CCT GCG TGG TTT GAG CCC TTC GTC ATC CAG		3602
Asp Arg Val Pro Glu Tyr Pro Ala Trp Phe Glu Pro Phe Val Ile Gln		

1180	1185	1190	
TGG TTA GAT GAG AAT GAG GAG GTG TCC CGG GAC TTC CTG CAT GGT GCA			3650
Trp Leu Asp Glu Asn Glu Glu Val Ser Arg Asp Phe Leu His Gly Ala			
1195	1200	1205	
CTC GAG CGG GAC AAG AAG GAT GGG TTC CAG CAG ACA TCG GAG CAC GCC			3698
Leu Glu Arg Asp Lys Lys Asp Gly Phe Gln Gln Thr Ser Glu His Ala			
1210	1215	1220	
CTG TTC TCT TGC TCG GTC GTG GAC GTC TTC TCC CAG CTC AAC CAG AGC			3746
Leu Phe Ser Cys Ser Val Val Asp Val Phe Ser Gln Leu Asn Gln Ser			
1225	1230	1235	1240
TTT GAG ATC ATC AAG AAG CTG GAG TGT CCT GAC CCC CAG ATT GTG GGC			3794
Phe Glu Ile Ile Lys Lys Leu Glu Cys Pro Asp Pro Gln Ile Val Gly			
1245	1250	1255	
CAC TAC ATG CGG CGC TTT GCC AAG ACC ATT AGC AAT GTG CTT CTC CAG			3842
His Tyr Met Arg Arg Phe Ala Lys Thr Ile Ser Asn Val Leu Gln			
1260	1265	1270	
TAC GCC GAC ATC GTC TCC AAG GAC TTC GCT TCC TAC TGC TCC AAG GAG			3890
Tyr Ala Asp Ile Val Ser Lys Asp Phe Ala Ser Tyr Cys Ser Lys Glu			
1275	1280	1285	
AAG GAG AAA GTG CCC TGC ATC CTC ATG AAC AAC ACA CAG CAG CTG CGG			3938
Lys Glu Lys Val Pro Cys Ile Leu Met Asn Asn Thr Gln Gln Leu Arg			
1290	1295	1300	
GTG CAG CTG GAG AAG ATG TTC GAG GCG ATG GGT GGG AAG GAG CTG GAC			3986
Val Gln Leu Glu Lys Met Phe Glu Ala Met Gly Gly Lys Glu Leu Asp			
1305	1310	1315	1320
GCC GAG GCC AGC GGA ACC CTG AAG GAG CTG CAG GTG AAA CTC AAC AAT			4034
Ala Glu Ala Ser Gly Thr Leu Lys Glu Leu Gln Val Lys Leu Asn Asn			
1325	1330	1335	
GTC CTG GAT GAA CTC AGC CAC GTG TTT GCC ACC AGC TTC CAG CCA CAC			4082
Val Leu Asp Glu Leu Ser His Val Phe Ala Thr Ser Phe Gln Pro His			
1340	1345	1350	
ATC GAG GAG TGT GTC AGA CAA ATG GGT GAC ATC CTA AGC CAA GTG AAG			4130
Ile Glu Glu Cys Val Arg Gln Met Gly Asp Ile Leu Ser Gln Val Lys			
1355	1360	1365	
GGC ACG GGC AAC GTG CCC GCC AGT GCC TGC AGC AGC GTG GCA CAG GAC			4178
Gly Thr Gly Asn Val Pro Ala Ser Ala Cys Ser Ser Val Ala Gln Asp			
1370	1375	1380	
GCA GAC AAC GTG CTA CAG CCC ATC ATG GAT CTT CTG GAC AGC AAC CTC			4226
Ala Asp Asn Val Leu Gln Pro Ile Met Asp Leu Leu Asp Ser Asn Leu			
1385	1390	1395	1400
ACC CTG TTT GCC AAA ATC TGT GAG AAG ACC GTT CTG AAG CGG GTG CTG			4274
Thr Leu Phe Ala Lys Ile Cys Glu Lys Thr Val Leu Lys Arg Val Leu			
1405	1410	1415	
AAG GAG CTG TGG AAG CTG GTG ATG AAC ACC ATG GAG AGG ACC ATT GTC			4322
Lys Glu Leu Trp Lys Leu Val Met Asn Thr Met Glu Arg Thr Ile Val			
1420	1425	1430	
CTG CCG CCA CTC ACT GAC CAG ACG ATG ATT GGT ACC CTC TTG AGA AAA			4370
Leu Pro Pro Leu Thr Asp Gln Thr Met Ile Gly Thr Leu Leu Arg Lys			
1435	1440	1445	
CAT GGC AAG GGC CTA GAA AAG GGC AGG GTG AAA CTG CCA AGC CAC TCA			4418

49

50

His	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Lys	Gly	Arg	Val	Lys	Leu	Pro	Ser	His	Ser	
1450				1455				1460								
GAC	GGG	ACA	CAA	ATG	ATC	TTC	AAT	GCC	GCC	AAG	GAG	CTG	GGC	CAG	CTG	4466
Asp	Gly	Thr	Gln	Met	Ile	Phe	Asn	Ala	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	Gln	Leu	
1465				1470				1475				1480				4514
TCC	AAA	CTG	AAG	GAT	CAC	ATG	GTG	CGA	GAA	GAA	GCC	AAG	AGC	TTG	ACC	
Ser	Lys	Leu	Lys	Asp	His	Met	Val	Arg	Glu	Glu	Ala	Lys	Ser	Leu	Thr	
1485				1490				1495								4562
CCG	AAG	CAG	TGT	GCC	GTG	GTT	GAA	CTG	GCC	CTG	GAC	ACC	ATC	AAG	CAA	
Pro	Lys	Gln	Cys	Ala	Val	Val	Glu	Leu	Ala	Leu	Asp	Thr	Ile	Lys	Gln	
1500				1505				1510								4610
TAC	TTC	CAC	GCG	GGG	GGC	GTG	GGC	CTC	AAG	AAG	ACC	TTT	CTC	GAG	AAA	
Tyr	Phe	His	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Leu	Lys	Lys	Thr	Phe	Leu	Glu	Lys	
1515				1520				1525								4658
AGC	CCG	GAC	CTT	CAG	TCC	CTG	CGC	TAC	GCC	CTG	TCG	CTC	TAC	ACA	CAG	
Ser	Pro	Asp	Leu	Gln	Ser	Leu	Arg	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Tyr	Thr	Gln	
1530				1535				1540								4706
GCC	ACC	GAC	CTG	CTC	ATC	AAA	ACC	TTC	GTG	CAG	ACG	CAG	TCA	GCG	CAG	
Ala	Thr	Asp	Leu	Leu	Ile	Lys	Thr	Phe	Val	Gln	Thr	Gln	Ser	Ala	Gln	
1545				1550				1555				1560				4754
GTC	CAT	GGT	GGA	AAG	GGG	ACT	AGG	TTT	ACC	CTT	AGT	GAA	GAC	GTT	TGT	
Val	His	Gly	Gly	Lys	Gly	Thr	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Glu	Asp	Val	Cys	
1565				1570				1575								4802
CCT	GAG	ATG	GGC	TCG	GGT	GTG	GAA	GAC	CCT	GTA	GGT	GAA	GTA	TCC	GTC	
Pro	Glu	Met	Gly	Ser	Gly	Val	Glu	Asp	Pro	Val	Gly	Glu	Val	Ser	Val	
1580				1585				1590								4850
CAC	GTG	GAG	CTG	TTC	ACG	CAT	CCG	GGG	ACT	GGG	GAA	CAG	AAG	GTC	ACA	
His	Val	Glu	Leu	Phe	Thr	His	Pro	Gly	Thr	Gly	Glu	Gln	Lys	Val	Thr	
1595				1600				1605								4898
GTG	AAG	GTG	GTG	GCC	GCC	AAC	GAC	CTC	AAG	TGG	CAG	ACT	TCT	GGC	ATC	
Val	Lys	Val	Val	Ala	Ala	Asn	Asp	Leu	Lys	Trp	Gln	Thr	Ser	Gly	Ile	
1610				1615				1620								4946
TTC	CGT	CCG	TTC	ATT	GAG	GTC	AAC	ATC	GTT	GGG	CCT	CAG	CTC	AGC	GAC	
Phe	Arg	Pro	Phe	Ile	Glu	Val	Asn	Ile	Val	Gly	Pro	Gln	Leu	Ser	Asp	
1625				1630				1635				1640				4994
AAG	AAA	CGA	AAG	TTC	GCC	ACC	AAA	TCG	AAA	AAC	AAC	AGC	TGG	GCG	CCC	
Lys	Lys	Arg	Lys	Phe	Ala	Thr	Lys	Ser	Lys	Asn	Asn	Ser	Trp	Ala	Pro	
1645				1650				1655				1655				5042
AAA	TAT	AAC	GAG	AGC	TTC	CAG	TTC	TCC	CTG	AGC	GCC	GCG	GGA	CCC		
Lys	Tyr	Asn	Glu	Ser	Phe	Gln	Phe	Ser	Leu	Ser	Ala	Asp	Ala	Gly	Pro	
1660				1665				1670								5090
GAG	TGC	TAC	GAG	TTG	CAG	GTG	GTG	AAG	GAC	TAC	TGC	TTC	GCG	CGC		
Glu	Cys	Tyr	Glu	Leu	Gln	Val	Cys	Val	Lys	Asp	Tyr	Cys	Phe	Ala	Arg	
1675				1680				1685								5138
GAG	GAC	CGC	ACG	GTG	GAG	CTG	GCG	GTG	CTG	CAG	CTG	CGG	GAG	CTG	GCT	
Glu	Asp	Arg	Thr	Val	Glu	Leu	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Arg	Glu	Leu	Ala	
1690				1695				1700								5186
CAG	CGC	GGG	AGC	GCC	GGC	TGC	TGG	CTG	CCG	CTC	GGC	CGC	CGC	ATC	CAC	
Gln	Arg	Gly	Ser	Ala	Ala	Cys	Trp	Leu	Pro	Leu	Gly	Arg	Arg	Ile	His	
1705				1710				1715				1720				

51

52

ATG GAC GAC ACG GGG CTC ACA GTG CTG CGT ATC CTG TCG CAG CGC AGC 5234
 Met Asp Asp Thr Gly Leu Thr Val Leu Arg Ile Leu Ser Gln Arg Ser
 1725 1730 1735
 AAT GAC GAG GTG GCC AAG GAG TTC GTC AAG CTC AAG TCC GAC ACG CGC 5282
 Asn Asp Glu Val Ala Lys Glu Phe Val Lys Leu Lys Ser Asp Thr Arg
 1740 1745 1750
 TCG GCC GAG GAG GGC GGT GCC GCG CCT GCG CCC TAG 5318
 Ser Ala Glu Glu Gly Ala Ala Pro Ala Pro
 1755 1760

【0104】配列番号：5

* 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCC TTCACATCAG TGTGGAGATC 30

【0105】配列番号：6

* 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCC ATGGGCGCAG GCGCGGGCACC

30

【0106】配列番号：7

★ 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：31

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCG AGAAGGTGGC ACCCTACCAT G 31

【0107】配列番号：8

☆ 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGCTTGGCA GTTTCACCCCT GCC 33

【0108】配列番号：9

◆ 鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGGTGGCAA ACACGTGGCT GAG 33

33

【0109】配列番号：10

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCT CAGAGTGCAC CATGCAGGAA GTC 33

【0110】配列番号：11

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：31

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGAATTCC TCGAGGGGGCA AAGAAGGAT G 31

31

【0111】配列番号：12

鎖の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

53

54

30

CATGAATTCA TGAAGCGACA TGGCCGGCGA

【0112】配列番号：13

配列の長さ：32

配列の型：核酸

配列：

CATAGCGCTC TTTCCCGAAA TTGGAGGCAG CG

32

* 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0113】配列番号：14

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATAGCGCTA GCCACTCAGA CGGGACACAA ATG

33

※ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0114】配列番号：15

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCC TAGGGCGCAG GCGCGGCACC

30

★ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0115】配列番号：16

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCA TGAGGGGCCG CAGGGGGCAT

30

☆ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0116】配列番号：17

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCT CAGGCGGTGG CATCATCCGA GTC

33

◆ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0117】配列番号：18

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCT CACTCCGCAC CATCCTCAGG CGT

33

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0118】配列番号：19

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCT CAGGGGAAGT AGTCAGAGAT CTG

33

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0119】配列番号：20

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCA TGACCATCAA CATCCAGGAG

30

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0120】配列番号：21

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCA TCCAGGAGCA CATGCCATC

30

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

【0121】配列番号：22

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

50

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

55

56

CATGAATTCT CAGATCTGGC GGATGGGCCG GAT

33

【0122】配列番号：23

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCA TCAACGTGTG CCCCCGGGCCA ATC

33

【0123】配列番号：24

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCC AAGGCAAGCT GGAGTTTGAC

30

【0124】配列番号：25

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCT CAGGCTGAGG ACAGAGCCCC

30

【0125】配列番号：26

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCA TGACCCCTCCG GCGGCGCGGG GAG

33

【0126】配列番号：27

配列の長さ：35

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCT CAGGCAGTGC AGTCGTCCGA CTCGT

35

【0127】配列番号：28

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCT ACGATGCATG GAAGGTGTAC

30

【0128】配列番号：29

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATGAATTCT CAGGTGCCTG TCTGGTCAAT GAG

33

【0129】配列番号：30

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列：

CATGGATCCA TGAGGGGCCG CAGGGCGAT

30

【0130】配列番号：31

配列の長さ：33

配列の型：核酸

配列：

CATGGATCCT CAGGCCGTGG CATCATCCGA GTC

33

【0131】配列番号：32

配列の長さ：31

配列の型：核酸

配列：

CATGGATCCT CAGGCCGTGG CATCATCCGA GTC

50 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCG AGAAGGTGGC ACCCTACCAT G

31

【0132】配列番号：33

配列の長さ：33

配列の型：核酸

* 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCT CAGCTTGGCA GTTTCACCCCT GCC

33

【0133】配列番号：34

配列の長さ：48

配列の型：核酸

※ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

※10 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

AATTCCGGTAC GATGTACCCA TACGACGTCC CAGACTACGC TGGTACCG

48

【0134】配列番号：35

配列の長さ：48

配列の型：核酸

★ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GATCCGGTAC CAGCGTAGTC TGGGACGTCG TATGGGTACA TCGTACCG

48

【0135】配列番号：36

配列の長さ：39

配列の型：核酸

☆ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

☆20 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GATCGATGGA GCAGAAGCTT ATCAGCGAGG AGGACCTGG

39

【0136】配列番号：37

配列の長さ：39

配列の型：核酸

◆ 鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

GATCCCAGGT CCTCCTCGCT GATAAGCTTC TGCTCCATC

39

【0137】配列番号：38

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCA TGAGGGGCCG CAGGGGGCAT

30

【0138】配列番号：39

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCT CAGGCTGAGG ACAGAGCCCC

30

【0139】配列番号：40

配列の長さ：33

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCT CACTGCTCCA AGTCCTTCAG ATA

33

【0140】配列番号：41

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCC TAGGCAAGCT GGAGTTTGAC

30

【0141】配列番号：42

配列の長さ：30

配列の型：核酸

50 鎖の数：1本鎖

59

60

トポロジー：直鎖状

* * 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCA TGAAGCCACA TGGCCGGCGA

30

【0142】配列番号：43

※ 鎮の数：1本鎖

配列の長さ：30

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCC TAGGGCGCAG GCGCGGCACC

30

【0143】配列番号：44

★ 鎮の数：1本鎖

配列の長さ：31

10 トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCG AGAAGGTGGC ACCCTACCAT G

31

【0144】配列番号：45

☆ 鎮の数：1本鎖

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列：

CATGGATCCT CAGCTTGGCA GTTTCACCCCT GCC

33

【図面の簡単な説明】

【図1】酵母two-hybrid法による、Munc13-1のDoc2 α との結合領域の解析結果を示す図表である。【図2】酵母two-hybrid法による、Doc2 α のMunc13-1との結合領域の解析結果を示す図表である。

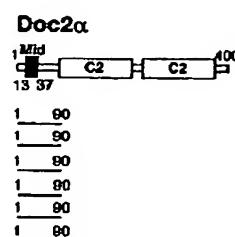
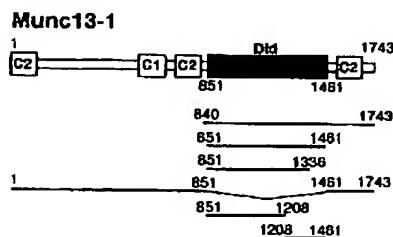
【図3】酵母two-hybrid法による、Doc2ファミリータンパク質がMunc13ファミリータンパク質と結合するかを解析した結果を示す図表である。

【図4】(a)大腸菌で作製し精製したMunc13-1-Didタンパク質と、in vitro translationにより作製したDoc2 α およびその欠失変異体タンパク質の、試験管内での結合実験の結果を示す電気泳動の写真である。(b)結合実験に用いたDoc2 α およびその欠失変異体タンパク質を示す図である。◆ 【図5】(a)大腸菌で作製し精製したDoc2 α -N末端タンパク質(1-90アミノ酸)と、in vitro translationにより作製したMunc13-1およびその欠失変異体タンパク質の、試験管内での結合実験の結果を示す電気泳動の写真である。

(b)結合実験に用いたMunc13-1およびその欠失変異体タンパク質を示す図である。

【図6】PC12細胞内で、Doc2 α とMunc13-1が結合することを免疫沈降法により示した、ウエスタンプロット解析の結果を示すX線写真である。【図7】Doc2 α -MidおよびMunc13-1-Didが、PC12細胞におけるカルシウムイオン依存性の分泌を抑制すること、成長ホルモンの分泌量を測定することにより調べた結果を示す図である。

【図1】

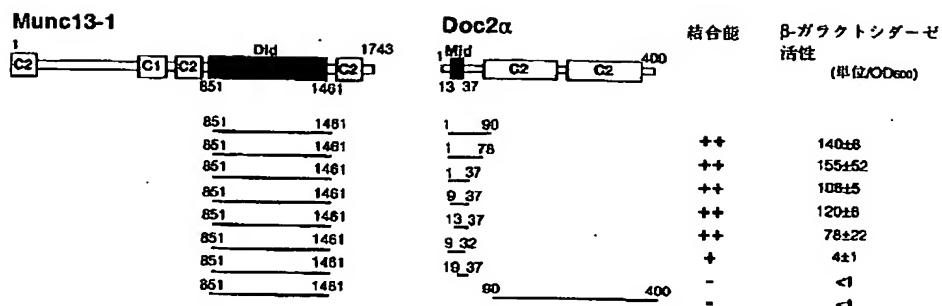


結合能	β -ガラクトシダーゼ活性 (単位/O D_{600})
++	150±17
++	140±8
+	17±9
-	<1
-	<1
-	<1

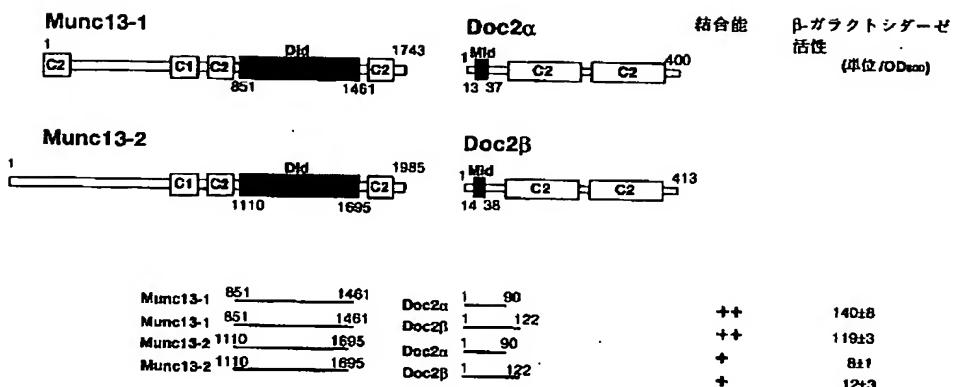
【図6】



【図2】

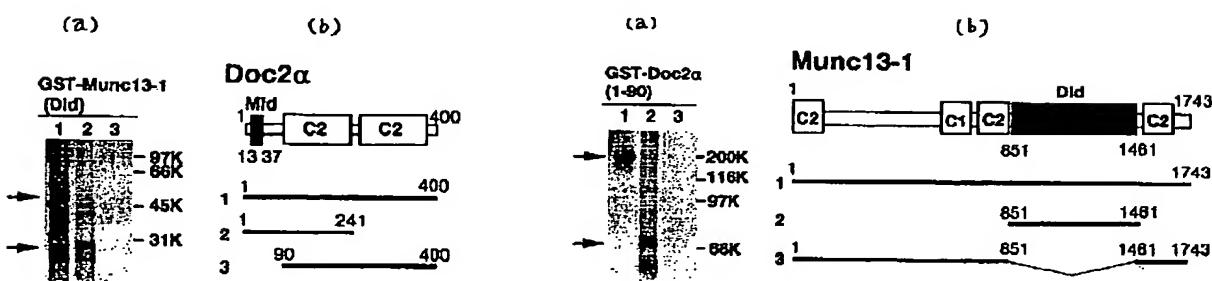


【図3】

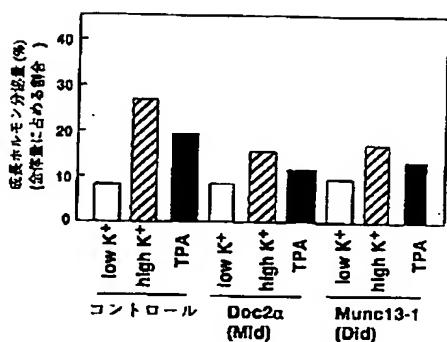


【図4】

【図5】



【図7】



BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶ 識別記号
C 1 2 P 21/02
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:91)

F 1
C 1 2 P 21/02
C

(72) 発明者 阪口 岳
大阪府吹田市昭和町13-16 グランシャリ
オミカサ301

(72) 発明者 高井 義美
兵庫県神戸市西区学園東町2-5-73